



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118369341 A

(43) 申请公布日 2024.07.19

(21) 申请号 202280063210.8

(22) 申请日 2022.08.19

(30) 优先权数据

2111905.2 2021.08.19 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/073195 2022.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/021187 EN 2023.02.23

(71) 申请人 UCB生物制药有限责任公司

地址 比利时

(72) 发明人 C·贝特乌 T·寇雷 N·德第

C·B·多勒 D·P·哈姆费雷斯

G·勒佛雷克 R·麦克霍内

V·奥道德 C·汤普森

K·L·泰森 A·L·怀特

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 刘晓东

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书149页

序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

抗HLA-G抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对HLA-G的抗体和包含其的制剂。本发明还涉及HLA-G抗体和制剂在治疗中、特别是在实体瘤的治疗中的用途。

1. 一种特异性结合HLA-G的抗体,其中所述抗体包含:
 - a. 轻链可变区,其包含:
 - i. 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1;
 - ii. 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2;和
 - iii. 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及
 - b. 重链可变区,其包含:
 - i. 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1;
 - ii. 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2;和
 - iii. 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体阻断HLA-G与ILT2和ILT4的结合和/或抑制HLA-G介导的免疫抑制功能。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体,其中所述抗体对于HLA-G具有小于10nM的平衡解离常数(KD)
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体,其特异性结合HLA-G α 3结构域。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合包含参照SEQ ID NO:107而言的残基F195和Y197的HLA-G表位。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合HLA-G的表位,所述表位包含HLA-G(SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。
7. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述表位通过X射线晶体学表征。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是嵌合的或人源化的。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含:
 - a. 含有SEQ ID NO:19或15或23的轻链可变区;和/或
 - b. 含有SEQ ID NO:93、27、33、57、69、75、81或87的重链可变区。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:93的重链可变区。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为全长抗体。
12. 根据权利要求11所述的抗体,其中所述全长抗体是IgG1、IgG1 LALA、IgG1 LALAGA、IgG4、IgG4P或IgG4P FALA。
13. 根据权利要求12所述的抗体,其中所述抗体是IgG1。
14. 根据权利要求13所述的抗体,其中所述抗体是无岩藻糖基化的IgG1。
15. 根据权利要求13或权利要求14所述的抗体,其中所述抗体包含:
 - a. 含有SEQ ID NO:21或17或25的轻链;和/或
 - b. 含有SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89的重链。
16. 根据权利要求13或权利要求14所述的抗体,其中所述抗体包含:
 - a. 与SEQ ID NO:21或17或25具有至少90%同一性或相似性的轻链;和/或
 - b. 与SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89具有至少90%同一性或相似性的重链。
17. 根据权利要求13或权利要求14所述的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:93的重链可变区,并且其中所述轻链和所述重链的其余部

分分别与SEQ ID NO:21和95具有至少90%同一性或相似性。

18. 根据权利要求13或权利要求14所述的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链。

19. 根据权利要求13-18中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制HLA-G介导的免疫抑制功能,并通过耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞来抑制肿瘤生长。

20. 根据权利要求14所述的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链,并且其中所述抗体具有改善的ADCC和/或ADCP和/或CDC功能,和/或具有改善的耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力。

21. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗体,其中所述抗体是Fab、Fab'、F(ab')₂、dsFv、scFv或dsFcFv。

22. 一种抗体,其与权利要求1所述的抗体交叉竞争与HLA-G的结合,或结合包含HLA-G (SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257的HLA-G表位。

23. 一种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求1至22中任一项所述的抗体。

24. 根据权利要求23所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码:

a. 轻链可变区,其中所述多核苷酸:

i. 与SEQ ID NO:20、16或24至少90%相同;或者

ii. 包含SEQ ID NO:20、16或24或者由其组成;或者

b. 重链可变区,其中所述多核苷酸:

i. 与SEQ ID NO:94、28、34、58、70、76、82或88至少90%相同;或者

ii. 包含SEQ ID NO:94、28、34、58、70、76、82或88或者由其组成。

25. 根据权利要求23所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码:

a. 轻链,其中所述多核苷酸:

i. 与SEQ ID NO:22、18或26至少90%相同;或者

ii. 包含SEQ ID NO:22、18或26或者由其组成;或者

b. 重链,其中所述多核苷酸:

i. 与SEQ ID NO:96、30、36、60、72、78、84或90至少90%相同;或者

ii. 包含SEQ ID NO:96、30、36、60、72、78、84或90或者由其组成。

26. 一种克隆或表达载体,其包含根据权利要求23-25中任一项所述的一种或多种多核苷酸。

27. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求23-25中任一项所述的一种或多种多核苷酸或者根据权利要求26的一种或多种表达载体。

28. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求23-25中任一项所述的一种或多种多核苷酸或者根据权利要求26所述的一种或多种表达载体,其中所述宿主细胞已被遗传修饰以降低或消除 α 1,6岩藻糖基转移酶的功能。

29. 一种用于生产根据权利要求1至22中任一项所述的抗体的方法,所述方法包括在产生所述抗体的合适条件下培养根据权利要求27或28所述的宿主细胞以及分离所述抗体。

30. 一种用于生产包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体的药物组合物的方法,所述方法包括权利要求29中定义的方法的步骤,以及进一步包括将所述抗体配制成药物组

合物。

31. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

32. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗。

33. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗特征在于HLA-G过表达的疾病。

34. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗实体肿瘤。

35. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌。

36. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物用于制造药物的用途。

37. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物用于制造用于治疗实体瘤的药物的用途。

38. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物用于制造用于治疗肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌的药物的用途。

39. 一种治疗患者的实体瘤的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述实体瘤选自肾透明细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌和肝细胞癌。

41. 一种通过使用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或根据权利要求31所述的药物组合物来诊断肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌的方法。

抗HLA-G抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及针对HLA-G的抗体和包含该抗体的制剂。本发明还涉及HLA-G抗体和制剂在治疗中、特别是在实体癌治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] I类人白细胞抗原 (HLA-I) 包括经典抗原HLA-A、HLA-B和HLA-C,以及非经典抗原HLA-E、HLA-F和HLA-G。人白细胞抗原G (HLA-G) 是在人体中表达的非经典HLA I类分子,由HLA-G基因编码。HLA-G是异二聚体分子,包含表现与轻链(即 β -2-微球蛋白(B2m))缔合的3个球状结构域(α_1 、 α_2 和 α_3)的重链。

[0004] 已经鉴定了HLA-G的七种同种型,其中四种是膜结合型(HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4),三种是可溶性型(HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7),它们是HLA-G初级转录物各种变通剪接的结果。

[0005] HLA-G通常在胎盘中的细胞滋养层细胞上表达。据报道,HLA-G的表达与诸如炎症疾病和癌症等病理状况相关。值得注意的是,据报道HLA-G是在实体癌中被特异性上调并与预后不良相关的致耐受性分子。

[0006] 已知HLA-G通过与在各种髓样细胞和淋巴样细胞上表达的至少三种受体结合而表现出免疫调节活性:

[0007] ●抑制性受体LILRB1(针对白细胞免疫球蛋白样受体B1),也称为ILT2或CD85j,在淋巴样细胞(B细胞、一些T细胞和NK细胞)和髓样细胞(单核细胞、巨噬细胞和树突细胞)上表达;

[0008] ●抑制性受体LILRB2(针对白细胞免疫球蛋白样受体B2),也称为ILT4或CD85d,在髓样细胞(单核细胞、巨噬细胞和树突细胞)上表达;和

[0009] ●调节受体KIR2DL4或CD158d,在NK细胞上表达。

[0010] HLA-G通过直接结合其抑制性受体来抑制免疫细胞的功能。据报道,HLA-G具有主要通过其 α_3 结构域与ILT2和ILT4的相互作用介导的致耐受性功能。ILT2只识别与B2m缔合的HLA-G分子,而ILT4同时识别与B2m缔合的HLA-G分子和与B2m不缔合的HLA-G分子。

[0011] 通过这种免疫抑制功能,肿瘤的HLA-G表达可以诱导免疫抑制环境,使肿瘤免疫逃逸并最终降低患者存活率。因此,抗体介导的HLA-G阻断可以提供有效的策略来缓解肿瘤局部免疫抑制,促进抗癌免疫的发展并提供持久的治疗。

[0012] 虽然在理论上,HLA-G阻断抗体的抗肿瘤作用可以通过包含能够与免疫效应细胞上的Fc γ R接合的活性Fc组分来增强,以允许直接杀死HLA-G+肿瘤细胞,但报道的HLA-G mRNA和蛋白质在许多正常组织(包括胰腺和垂体)中的表达表明,使用活性Fc可导致不可接受的毒性,因此排除了其在治疗中的应用。

[0013] HLA-G与其它HLA-I分子(即HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E和HLA-F)具有高度相似性。在HLA-G蛋白的338个氨基酸位置中,只有20个位置是HLA-G特有的,并且不存在于约5000种人HLA-I分子的任何其它种HLA-I分子中的该位置上的残基。这使得产生对HLA-G具有高特异性而对其它HLA-I分子没有交叉反应性的抗体非常具有挑战性。

[0014] 如今已有商用HLA-G抗体。然而,据报道,一些HLA-G抗体缺乏对HLA-G的特异性(例如与其它HLA-I分子交叉反应),并且都在HLA-G的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域中具有表位,所述表位远离 $\alpha 3$ 结构域中的HLA-G ILT2/4结合位点,因此预计不会阻断HLA-G与ILT2和/或ILT4之间的相互作用。据报道,与HLA-G $\alpha 1$ 结构域中的表位接合的抗体87G可解除HLA-G对免疫细胞功能的抑制。然而,还没有87G和其它商购可得的HLA-G抗体能够阻断HLA-G ILT2/4相互作用的报道。由于其缺乏特异性和/或阻断活性,商购可得的抗体不适于开发HLA-G治疗性抗体。

[0015] 与HLA-G结合的其它抗体已在W019202040和W02020069133中报道,尽管此类抗体似乎调节一种或多种HLA-G活性,但它们在HLA-G上的结合位点(即表位)尚未被表征。

[0016] 迄今为止,抗HLA-G抗体的疗效尚未在患者中得到证实(特别是对于实体癌的治疗)。

[0017] 因此,仍然需要提供结合HLA-G并具有可用于治疗的生物学特性的抗体,所述生物学特性是例如在人的改善的药物代谢动力学特性和/或改善的生物学功能(例如特异性、结合亲和力、中和和/或细胞毒性和吞噬作用)和/或降低的毒性。

发明内容

[0018] 本发明通过提供新的抗HLA-G抗体解决了上述需求,所述抗体可用于治疗,特别是用于治疗实体癌,具有本文所述的结构和功能特性,特别是对HLA-G的高度特异性,能够阻断HLA-G与其受体ILT2和ILT4的相互作用。我们提供了证据表明本发明抗体识别的表位不存在于正常组织(包括垂体和胰腺)中,从而首次支持包含活性Fc的抗体形式的应用,该抗体形式能够在患者体内指导肿瘤细胞杀伤。

[0019] 特别地,本发明提供了特异性结合人HLA-G的抗体,其包含:

[0020] a. 轻链可变区,其包含:

[0021] 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1,

[0022] 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2,和

[0023] 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0024] b. 重链可变区,其包含:

[0025] 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1,

[0026] 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2,和

[0027] 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

附图说明

[0028] 图1:HLA-G同种型(Carosella等人,Blood,第111卷,n°10,2008的图1B)。

[0029] 图2. 抗体12389的兔可变轻链序列的人源化。移植物12389gL1、gL2和gL3是使用IGKV1D-13人种系作为受体框架的抗体12389的兔可变轻链的人源化移植物。CDR以粗体/下划线标示。供体残基以粗体/斜体标示,并带有灰色阴影:V3和Q70。

[0030] 图3. 抗体12389的兔可变重链序列的人源化。移植物12389gH1、gH4、gH5、gH6、gH8、gH9、gH11、gH12、gH13、gH14、gH15和gH16是使用IGHV3-66人种系作为受体框架的抗体12389的兔可变重链的人源化移植物。CDR以粗体/下划线标示。供体残基以粗体/斜体标示,并带有灰色阴影:V24、I48、G49、K71、S73、V78和G96。

[0031] 图4. 来自50名不同供体的PBMC检测中的HLA-G02的特异性。结果表示为每个供体和抗体的每个CD4⁺细胞群的MFI。

[0032] 图5. HLA-G02的特异性; 与细胞上表达的HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3和HLA-G4的结合(图5A), 与HLA-G2的结合(图5B)。

[0033] 图6. 用不同的抗HLA-G抗体或IgG1同种型对照抗体处理后, 耗竭的Epcam+GFP+HCT116靶细胞的百分比。以1 μ g/ml(白色条)或0.01 μ g/ml(条纹条)的两种不同浓度测试每种抗体。E:T比率为3.5:1。每个条代表三个数据点的平均值(和范围), 每个点/正方形是单独的重复。数据来自一个代表性供体。HLA-G01至HLA-G08由其各自的ID号(01至08)表示。

[0034] 图7. 在用来自三个独立实验(3个不同供体)的抗HLA-G抗体HLA-G01和HLA-G02或IgG1同种型对照抗体处理后, 耗竭的Epcam+GFP+HCT116靶细胞的百分比。以1 μ g/ml(图7A)或0.01 μ g/ml(图7B)测试抗体。E:T比率介于2.5:1与3:1之间。每个条代表来自单个实验的数据的平均值(和范围), 每个点、正方形或三角形是单独的重复。

[0035] 图8. 与同种型对照IgG1相比, 用抗HLA-G抗体HLA-G01和HLA-G02(横轴: 以 μ g/ml为单位的抗体浓度)的滴定处理后Epcam+GFP+HCT116细胞的百分比耗竭(纵轴)。E:T比率为4:1。每个点代表3个重复的平均值(和范围)。显示的数据来自单个代表性供体。

[0036] 图9A. 用常规HLA-G02 IgG1(实线)或无岩藻糖基化的HLA-G02IgG1(“aF HLA-G02”, 虚线)处理后JEG3细胞的耗竭百分比(纵轴)。横轴: 以 μ g/ml为单位的抗体浓度。E:T比率为10:1。每个点代表2个重复的平均值(和范围)。数据来自单个代表性供体。

[0037] 图9B. 与同种型对照IgG1相比, 用常规HLA-G02 IgG1(实线)或无岩藻糖基化的HLA-G02 IgG1(“aF HLA-G02”, 虚线)处理后Epcam+GFP+HCT116细胞的耗竭百分比(纵轴)。横轴: 以 μ g/ml为单位的抗体浓度。E:T比率为5:1。每个点代表3个重复的平均值(和范围)。数据来自单个代表性供体。

[0038] 图10. 与抗CD47抗体(“aCD47”)和同种型对照IgG1相比, HLA-G02在模拟物转染的(图10A)和HLA-G/B2m转染的K562靶细胞(图10B)上的HLA-G特异性吞噬活性的滴定。纵轴: CTY+CD11b⁺双阳性细胞的百分比; 横轴: 以 μ g/ml为单位的抗体浓度。

[0039] 图11. 与抗CD47抗体和同种型对照IgG1相比, HLA-G02的常规和无岩藻糖基化(aF)形式在模拟物转染的(图11A)和表达HLA-G的K562靶细胞(图11B)上的HLA-G特异性吞噬活性的滴定。纵轴: CTY+CD11b⁺双阳性细胞的百分比; 横轴: 以 μ g/ml为单位的抗体浓度。

[0040] 图12. VR12389(黑色表面表示)阻断了HLA-G与ILT-2和ILT4的相互作用。图12A: ILT2(卡通, 白色)与HLA-G(卡通, 灰色)和 β 2M(网格, 灰色)的复合物的晶体结构(PDB ID 6AEE)。图12B: VR12389与HLA-G和 β 2M的复合物的晶体结构叠加显示VR12389(表面, 黑色)阻断ILT2与HLA-G的相互作用。图12C: ILT4(卡通, 白色)与HLA-G(卡通, 灰色)和 β 2M(网格, 灰色)的复合物的晶体结构(PDB ID 2DYP)。图12D: VR12389与HLA-G和 β 2M的复合物的晶体结构叠加显示VR12389(表面, 黑色)阻断ILT4与HLA-G的相互作用。

[0041] 图13. 肿瘤细胞杀伤测定。图13A: 用抗PDL1从RCC获得的数据。图13B: 用抗PDL1从CRC获得的数据。图13C: 用HLA-G02从RCC获得的数据。图13D: 用HLA-G02从CRC获得的数据。数据表示为死亡细胞%, 浅灰色为同种型对照, 深灰色为抗PDL1或HLA-G02, 抗PDL1或HLA-G02处理的培养物为黑色, 其中观察到细胞死亡增加1.5倍或更多。

[0042] 图14. 用常规或无岩藻糖基化的HLA-G02处理2.5h至3h后, 以不同的效应子: 靶标

比率进行的HLA-G转染的HCT116细胞的耗竭。通过流式细胞术测定活HLA-G GFP+HCT116细胞的数量,并计算相对于无抗体对照的耗竭百分比(纵轴)。横轴:E:T比率(效应子:靶标比率)。显示的数据来自单个供体(1)。每个数据点代表3个重复的平均值。误差条代表95%的置信区间。

[0043] 图15. PBMC测定中来自10名不同供体的无岩藻糖基化的HLA-G02 (“aF HLA-G02”)的特异性。结果表示为每个供体和抗体的每个CD4+细胞群的MFI。

[0044] 图16. 无岩藻糖基化的HLA-G02介导的CDC。图16A:血清活性对HLA-G-β2m-Reh细胞裂解的影响(浓度-反应曲线描述了在活性或热灭活血清存在的情况下,aF HLA-G02介导的HLA-G-β2m-Reh的CDC。纵轴:以最小和最大对照作归一化的裂解率(%) (N=1, 4-PL拟合);横轴:抗体浓度[M])。图16B:aF HLA-G02介导的裂解对HLA-G的依赖性(浓度-反应曲线描绘了aF HLA-G02介导的HLA-G-β2m-Reh或Reh细胞的CDC。纵轴:以最小和最大对照作归一化的裂解率(%) (N=1, 4-PL拟合);横轴:抗体浓度[M])。图16C:aF HLA-G02介导的HLA-G-β2m-Reh细胞的CDC(浓度-反应曲线描绘aF HLA-G02介导的HLA-G-β2m-Reh的CDC。纵轴:以最小和最大对照作归一化的裂解率(%) (N=3, 平均值±SEM, 4-PL拟合);横轴:抗体浓度[M])。

[0045] 图17. 与αCD47抗体相比,HLA-G02和无岩藻糖基化的HLA-G02对表达HLA-G的靶细胞或模拟物转染的细胞的吞噬作用的浓度依赖性效应。图17A和图17B:代表性数据(平均值±SD)(纵轴:CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比;横轴:以μg/ml为单位的抗体浓度)。图17C和图17D:以一式两份使用来自三个不同供体的单核细胞在两个独立实验中产生的组合数据(纵轴:根据同种型对照调整的吞噬作用百分比=(抗体平均值-同种型平均值)±SD;横轴:以μg/ml为单位的抗体浓度)。

[0046] 图18. 无岩藻糖基化的HLA-G02介导的靶细胞杀伤。过夜孵育后(来自四个单独的供体,一式两份,在两个独立的实验中),用不同浓度的无岩藻糖基化的HLA-G02或αCD47(横轴,以μg/ml为单位)通过ADCP产生的表达HLA-G的靶细胞的耗竭百分比(纵轴)。与同种型对照相比的平均值和标准偏差。

[0047] 图19. 与相应的同种型对照相比,无岩藻糖基化的HLA-G02和HLA-G02 IgG4P FALA单独地(图19A)或与抗CD47抗体(1μg/mL,图19B)组合地对HLA-G表达细胞的吞噬作用的浓度依赖性效应的代表性数据。纵轴:CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比;横轴:以μg/ml为单位的抗体浓度。

[0048] 图20. 用单独的或与抗CD47抗体组合的无岩藻糖基化的HLA-G02(1μg/mL)处理的HLA-G表达细胞的吞噬作用。图20A表示无岩藻糖基化的HLA-G02的数据(三个供体,一式两份,两个独立的实验)。图20B表示HLA-G02 IgG4P FALA的数据(来自四个供体的组合的数据,以一式两份分析每个供体,三个独立的实验)。针对各自的同种型对照调整吞噬值(% ,纵轴)(Ab平均值-同种型平均值),并表示为平均值±SD。横轴:以μg/ml为单位的抗体浓度。

[0049] 图21. 在JEG3细胞存在和不存在的情况下在PBMC培养物中产生的细胞因子水平(纵轴,pg/ml)(图21A:IFN γ;图21B:TNFα;图21C:IL-2;图21D:IL-6;图21E:IL-8;图21F:IL-10)横跨无岩藻糖基化的HLA-G02的浓度范围(横轴,μg/ml)。所有16名PBMC供体的数值均为平均值±标准差。虚线表示在50μg/ml的无岩藻糖基化的同种型对照抗体、50μg/ml的抗CD3抗体或100ng/ml的LPS存在的情况下产生的每种细胞因子的平均水平。

[0050] 发明详述

[0051] 现在将参考特定的非限制性方面及其实施方案并参考某些附图和示例来描述本公开。

[0052] 除非另有说明,否则技术术语按其通常的意义使用。如果某些术语具有特定含义,将在使用术语的上下文中给出术语的定义。

[0053] 在本说明书和权利要求中使用术语“包含”时,其不排除其它要素。出于本公开的目的,术语“由……组成(consisting of)”被认为是术语“由……组成(comprising of)”的优选实施方案。

[0054] 在当提及单数名词时使用不定冠词或定冠词(例如,“一个/种(a)”、“一个/种(an)”或“该(the)”)的情况下,除非另有明确说明,否则这包括该名词的复数形式。

[0055] 本公开提供了抗HLA-G抗体。在第一方面,本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体,其包含:

[0056] a. 轻链可变区,其包含:

[0057] 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1,

[0058] 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2,和

[0059] 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0060] b. 重链可变区,其包含:

[0061] 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1,

[0062] 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2,和

[0063] 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0064] HLA-G

[0065] 术语“HLA-G”或“人HLA-G”是指人白细胞抗原G,其是经典的HLA-I分子,也称为人主要组织相容性复合体I分子(MHC)。通常,HLA-G与B2m一起形成MHC-I复合物。

[0066] 除非另有说明,否则术语“HLA-G”是指由细胞天然表达的人HLA-G的任何选择性剪接变体或天然变体或同种型。完全人HLA-G的示例性序列包含SEQ ID NO:107中给出的序列。

[0067] 在一些方面,本发明的抗体选择性结合HLA-G的胞外结构域(ECD)(或“HLA-G ECD”)。HLA-G ECD的示例性序列包含SEQ ID NO:108中给出的序列。

[0068] HLA-G及其同种型的氨基酸和核酸序列在本领域也是众所周知的。

[0069] 已经鉴定了HLA-G的七种同种型,其中四种是膜结合型(HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4),三种是可溶性型(HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7),它们是HLA-G初级转录物变通剪接的结果(图1)。肾脏肿瘤的mRNA分析提示了其它同种型,其中一些没有 $\alpha 1$ 结构域,但这些同种型尚未在蛋白质水平得到证实(Tronik-Le Roux等人,Molecular Oncology 11(2017) 1561-1578)。

[0070] HLA-G1和HLA-G5具有与经典HLA-I分子类似的结构,即异二聚体分子,其包含显示3个球状结构域(α_1 、 α_2 和 α_3)的重链,与轻链(即 β -2-微球蛋白(缩写为“ $\beta 2m$ ”或“B2m”))缔合。HLA-G1和HLA-G5也可作为游离 α 链存在,即不与B2m复合。

[0071] HLA-G2和HLA-G6仅包含 $\alpha 1$ 和 $\alpha 3$ 结构域。HLA-G4仅包含 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域。HLA-G3和HLA-G7仅包含 $\alpha 1$ 结构域。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的抗体结合HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、

HLA-G6和HLA-G7中的至少一种。在一个实施方案中,本发明的抗体在与B2m复合时以及当作为B2m游离分子表达时,与包含 $\alpha 3$ 结构域的所有HLA-G同种型结合,即与HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6结合,包括与HLA-G1和HLA-G5结合。

[0073] HLA-G1与HLA-G5可以形成同多聚体,诸如二硫键合的二聚体和三聚体。在一个实施方案中,本发明的抗体结合单体HLA-G。在一个实施方案中,本发明的抗体结合二聚HLA-G。在一个实施方案中,本发明的抗体结合三聚HLA-G。在一个实施方案中,本发明的抗体结合单体HLA-G、二聚HLA-G和三聚HLA-G。

[0074] 与HLA-G结合的抗体

[0075] 用于本公开内容的抗体包括完整抗体及其功能活性片段(即,含有特异性结合抗原的抗原结合结构域的分子,也称为抗原结合片段)。除非上下文另有说明,否则本文描述的关于抗体的特征也适用于抗体片段。抗体可以是(或源自)单克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、完全人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0076] 完整抗体,也称为“免疫球蛋白(Ig)”,通常涉及完整或全长抗体,即包含通过二硫键相互连接的两条重链和两条轻链的元件,其装配以限定特征性Y形三维结构。经典的天然完整抗体是单特异性的,因为它们结合一种抗原类型;并且是二价的,因为它们具有两个独立的抗原结合域。术语“完全抗体”、“全长抗体”和“完整抗体”可互换使用,是指具有与天然抗体结构(包括本文定义的Fc区)类似的结构单特异性二价抗体。

[0077] 在完整抗体中,每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区(CL)组成。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区(CH)组成,根据Ig类别,重链恒定区由三个恒定结构域CH1、CH2和CH3或四个恒定结构域CH1、CH2、CH3和CH4组成。Ig或抗体的“类别”是指恒定区的类型,包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几种可被进一步分为亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0078] 根据本发明的抗体的VH和VL区可被进一步细分为决定抗原识别的高度变异区域(或“高变区”或HVR),称为互补决定区(CDR),其间散布有结构更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。CDR和FR一起形成可变区。按照惯例,抗体或其抗原结合片段的重链可变区中的CDR被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,而轻链可变区中的CDR被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。将它们按照从每条链的N-末端至C-末端的方向顺序编号。

[0079] 通常根据Kabat等人设计的系统对CDR进行编号。该系统由Kabat等人于1991年在Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA(在下文中称为“Kabat等人”(同上))中进行了阐述。除非另有说明,否则本说明书中使用该编号系统。

[0080] Kabat残基命名并不总是直接对应于氨基酸残基的线性编号。实际的线性氨基酸序列可包含比严格Kabat编号中更少或更多的氨基酸,对应于基本可变结构域结构的结构组件(无论是框架还是互补决定区(CDR))的缩短或插入。通过将抗体序列中的同源性残基与“标准”Kabat编号的序列进行比对,可以确定给定抗体的残基的正确Kabat编号。

[0081] 根据Kabat编号系统,重链可变结构域的CDR位于残基31-35(CDR-H1)、残基50-65(CDR-H2)和残基95-102(CDR-H3)。然而,根据Chothia(Chothia,C.和Lesk,

A.M.J.Mol.Biol.,196,901-917(1987)),相当于CDR-H1的环从残基26延伸至残基32。因此,除非另有说明,否则本文使用的‘CDR-H1’旨在指残基26至35,如通过Kabat编号系统与Chothia’s拓扑环定义的组合所述的。

[0082] 根据Kabat编号系统,轻链可变结构域的CDR位于残基24-34(CDR-L1)、残基50-56(CDR-L2)和残基89-97(CDR-L3)。

[0083] 除了CDR环之外,在CDR-2(CDR-L2或CDR-H2)与CDR-3(CDR-L3或CDR-H3)之间还存在第四个环,该环由框架3(FR3)形成。Kabat编号系统将框架3界定为重链中的位置66-94和轻链中的位置57-88。

[0084] 基于免疫球蛋白家族的不同成员的序列比对,已经提出了编号方案,并且例如描述于Kabat等人1991和Dondelinger等人,2018,Frontiers in Immunology,第9卷,论文2278中。

[0085] 本发明的抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDR-L1、含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和含有SEQ ID NO:3的CDR-L3,所述重链可变区包含含有SEQ ID NO:4的CDR-H1、含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0086] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19的轻链可变区的CDR,所述重链可变区包含SEQ ID NO:93的重链可变区的互补决定区。

[0087] 包含此类CDR序列的抗体是特别有创造性的,因为它们提供了对HLA-G具有高亲和力、对HLA-G具有高特异性(特别是与其它HLA-I分子没有交叉反应性,尽管它们具有非常高的同源性)、对HLA-G生物学功能具有高度抑制性以及可对可制造性至关重要的高稳定性的抗体。此外,当与活性Fc组合时,它们提供了具有直接杀死HLA-G+肿瘤细胞的能力的抗体。

[0088] 如本文中所示,术语“恒定结构域”、“恒定区”可互换使用,是指在可变区外部的抗体的结构域。相同同种型的所有抗体的恒定结构域是相同的,但一个同种型与另一个同种型之间是不同的。典型地,重链的恒定区从N端至C端由CH1-铰链-CH2-CH3-任选的CH4形成,包含三个或四个恒定结构域。

[0089] 本发明的抗体分子的恒定区结构域(如果存在)可以根据抗体分子的预期功能,特别是可能需要的效应子功能进行选择。例如,恒定区结构域可以是人IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地,当抗体分子旨在用于治疗用途并且需要抗体效应子功能时,可以使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型的恒定区结构域。或者,当抗体分子旨在用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型。应当理解,也可以使用这些恒定区结构域的序列变体。例如,可使用其中位置241处的丝氨酸(根据Kabat编号系统编号的)已被改变为脯氨酸的IgG4,其如Angal等人(Angal等人,1993.A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody as observed during SDS-PAGE analysis Mol Immunol 30,105-108)中所述并且在本文中称为IgG4P。

[0090] “Fc”、“Fc片段”和“Fc区”可互换使用,是指包含除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的抗体恒定区的抗体的C端区。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定结构域C_{H2}和C_{H3},或IgE和IgM的最后三个恒定区,以及这些结构域的N-末端的柔性铰链。人IgG1重链Fc区在本文中被定义为包含残基C226至其羧基末端,其中编号根据如Kabat中的EU索引。根据如

Kabat中的EU索引,在人IgG1的情况下,下铰链是指位置226-236,CH2结构域是指位置237-340,CH3结构域是指位置341-447。其它免疫球蛋白的相应Fc区可通过序列比对来鉴定。

[0091] 在本公开的说明书中,当存在时,恒定区或Fc区可以是如上定义的天然的,或者可以以各种方式修饰,条件是其包含功能性FcR结合结构域,并且优选包含功能性FcRn结合结构域。优选地,经修饰的恒定区或Fc区导致功能性和/或药代动力学的改善。所述修改可包括删除Fc片段的某些部分。所述修饰还可包括能够影响抗体的生物学特性的各种氨基酸取代。还可能存在增加FcRn结合从而延长体内半衰期的突变。所述修饰还可包括抗体的糖基化特征谱的修饰。天然Fc片段在CH2结构域中被糖基化,在两条重链的每一条上都存在与位置297处的天冬酰胺残基(Asn297)结合的N-聚糖。在本公开的说明书中,抗体可以是糖修饰的,即被工程化以具有特定的糖基化特征谱,这例如导致改善的特性,例如改善的效应子功能和/或改善的血清半衰期。

[0092] 本文描述的抗体是分离的。“分离的”抗体是从其自然环境的组成中分离出来的抗体(例如通过纯化手段)。

[0093] 术语“抗体”涵盖单价抗体,即仅包含一个抗原结合结构域的抗体(例如包含相互连接的全长重链和全长轻链的单臂抗体,也称为“半抗体”),和多价抗体,即包含不止一个抗原结合结构域的抗体。

[0094] 根据本发明的术语“抗体”还涵盖抗体的抗原结合片段。

[0095] 抗体的抗原结合片段包括单链抗体(例如scFv和dsscFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体或纳米抗体(例如VH或VL、或VHH或VNAR)。用于本发明的其它抗体片段包括国际专利申请W02011/117648、W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171中描述的Fab和Fab'片段。

[0096] 用于产生和制造这些抗体片段的方法是本领域公知的(参见例如Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。

[0097] 本文所用术语“Fab片段”是指这样的抗体片段,其包含含有轻链的VL(可变轻链)结构域和恒定结构域(CL)的轻链片段以及重链的VH(可变重链)结构域和第一恒定结构域(CH1)。

[0098] 典型的“Fab'片段”包含重链和轻链对,其中重链包含可变区VH、恒定结构域CH1和天然或经修饰的铰链区,轻链包含可变区VL和恒定结构域CL。根据本公开的Fab'的二聚体产生F(ab')₂,其中例如二聚化可通过铰链进行。

[0099] 本文所用的术语“单结构域抗体”是指由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。单结构域抗体的实例包括VH或VL或VHH或VNAR。

[0100] “Fv”是指两个可变结构域,例如协同的可变结构域,诸如同源对或亲和力成熟的可变结构域,即VH和VL对。

[0101] 本文使用的“单链可变片段”或“scFv”是指由VH与VL可变结构域之间的肽接头稳定化的单链可变片段。

[0102] 本文使用的“二硫键稳定化的单链可变片段”或“dsscFv”是指由VH与VL可变结构域之间的肽接头稳定化的单链可变片段,并且还包括VH与VL之间的结构域间二硫键。参见例如Weatherill等人,Protein Engineering,Design&Selection,25(321-329),2012,W02007109254。

[0103] 在一个实施方案中,可变结构域VH与VL之间的二硫键位于下面列出的两个残基之间(除非上下文另有说明,否则在下面的列表中采用Kabat编号)。只要提到Kabat编号,相关的参考文献是Kabat等人,1991(第5版,Bethesda,Md.),Sequences of Proteins of Immunological Interest,USDepartment of Health and Human Services,NIH,USA。

[0104] 在一个实施方案中,二硫键位于选自由以下组成的组的位置处:

[0105] ●VH37+VL95C,参见例如Protein Science 6,781-788 Zhu等人(1997);

[0106] ●VH44+VL100,参见例如Weatherill等人,Protein Engineering,Design& Selection,25(321-329),2012;

[0107] ●VH44+VL105,参见例如J Biochem.118,825-831 Luo等人(1995);

[0108] ●VH45+VL87,参见例如Protein Science 6,781-788 Zhu等人(1997);

[0109] ●VH55+VL101,参见例如FEBS Letters 377 135-139 Young等人(1995);

[0110] ●VH100+VL50,参见例如Biochemistry 29 1362-1367Glockshuber等人(1990);

[0111] ●Vh100b+VL49;参见例如Biochemistry 29 1362-1367Glockshuber等人(1990);

[0112] ●VH98+VL46,参见例如Protein Science 6,781-788 Zhu等人(1997);

[0113] ●VH 101+VL46;参见例如Protein Science 6,781-788 Zhu等人(1997);

[0114] ●VH105+VL43,参见例如Proc.Natl.Acad.Sci.USA第90卷,第7538-7542页 Brinkmann等人(1993);或Proteins 19,35-47 Jung等人(1994);

[0115] ●VH106+VL57,参见例如FEBS Letters 377 135-139 Young等人(1995);

[0116] 以及位于所述分子中的可变区对中与之一对应的一个或多个位置。

[0117] 在一个实施方案中,二硫键在位置VH44与VL100之间形成。

[0118] 多特异性抗体

[0119] 本发明的抗体可以是多特异性抗体。本文使用的“多特异性(Multispecific)或多特异性(Multi-specific)抗体”是指本文所述的抗体,其具有至少两个结合结构域,即两个或更多个结合结构域,例如两个或三个结合结构域,其中至少两个结合结构域独立地结合两种不同的抗原或同一抗原上的两个不同表位。多特异性抗体通常对每种特异性(抗原)都是单价的。本文所述的多特异性抗体涵盖单价和多价,例如二价、三价、四价多特异性抗体。

[0120] 在一个实施方案中,构建体是双特异性抗体。本文使用的“双特异性(Bispecific)或双特异性(Bi-specific)抗体”是指具有两种抗原结合特异性的抗体。在一个实施方案中,抗体包含两个抗原结合结构域,其中一个结合结构域结合抗原1,另一个结合结构域结合抗原2,即每个结合结构域对于每种抗原都是单价的。在一个实施方案中,抗体是四价双特异性抗体,即抗体包含四个抗原结合结构域,其中例如两个结合结构域结合抗原1,另外两个结合结构域结合抗原2。在一个实施方案中,抗体是三价双特异性抗体。

[0121] 在一个实施方案中,抗体构建体是三特异性抗体。本文使用的“三特异性(Trispecific)或三特异性(Tri-specific)抗体”是指具有三种抗原结合特异性的抗体。例如,抗体是具有三个抗原结合结构域(三价)的抗体,其独立地结合三种不同的抗原或同一抗原上的三种不同表位,即每个结合结构域对于每种抗原都是单价的。

[0122] 抗体结合部位(paratope)是抗体中识别并结合抗原的区域。本发明的抗体可以是多抗体结合部位的抗体。本文使用的“多抗体结合部位的抗体”是指本文所述的包含两个或更多个不同的抗体结合部位的抗体,所述抗体结合部位与来自同一抗原或两种不同抗原的

不同表位相互作用。本文所述的多抗体结合部位抗体可以是双抗体结合部位抗体、三抗体结合部位抗体、四抗体结合部位抗体。

[0123] 本文使用的“抗原结合结构域”是指抗体的一部分,其包含一个或多个可变结构域的一部分或全部,例如一对可变结构域VH和VL的一部分或全部,其与靶抗原特异性相互作用。结合结构域可包含单结构域抗体。在一个实施方案中,每个结合结构域都是单价的。优选地,每个结合结构域包含不超过一个VH和一个VL。

[0124] 已经产生了多种多特异性抗体形式。已经提出了不同的分类,但是多特异性IgG抗体形式通常包括双特异性IgG、附加IgG、多特异性(例如双特异性)抗体片段、多特异性(例如双特异性)融合蛋白和多特异性(例如双特异性)抗体缀合物,如例如在Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106*中所描述的。

[0125] 制备双特异性抗体的技术包括但不限于CrossMab技术(Klein等人 *Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology, Methods 154 (2019) 21-31*)、杵臼结构工程(Knobs-in-holes engineering)(例如W01996027011、W01998050431)、DuoBody技术(例如W02011131746)、Azymetric技术(例如W02012058768)。用于制备双特异性抗体的其它技术已描述于例如Godar等人 *Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 28:3, 251-276*中。双特异性抗体特别包括CrossMab抗体、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、杵臼结构普通LC(Knobs-in-holes common LC)、杵臼结构组装(Knobs-in-holes assembly)、电荷对、Fab-臂交换、SEEDbody、Triomab、LUZ-Y、Fcab、 $\kappa\lambda$ -体和正交Fab。

[0126] 附加的IgG通常包括通过在IgG的重链和/或轻链的N末端和/或C末端附加额外的抗原结合结构域或抗原结合片段而工程改造的全长IgG。此类额外的抗原结合片段的实例包括sdAb抗体(例如VH或VL)、Fv、scFv、dsccFv、Fab、scFav。附加的IgG抗体形式特别地包括DVD-IgG, lgG(H)-scFv, scFv-(H)lgG, lgG(L)-scFv, scFv-(L)lgG, lgG(L,H)-Fv, lgG(H)-V, V(H)-lgG, lgC(L)-V, V(L)-lgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-lgG, lgG-2scFv, scFv4-lg, Zy体和DVI-IgG(四合一), 例如如Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106*中所描述的。

[0127] 多特异性抗体片段包括纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTEs、双抗体、DART、TandAb、scDiabody、sc-双抗体-CH3、双抗体-CH3、三体(Triple Body)、微抗体(Miniantibody);微型抗体(Minibody)、Tri Bi微型抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc;和胞内抗体(intrabody), 如例如Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106*中所描述的。

[0128] 多特异性融合蛋白包括Dock和Lock、ImmTAC、HSAbody、scDiabody-HAS和串联scFv-毒素。

[0129] 多特异性抗体缀合物包括IgG-IgG;Cov-X-Body;和scFv1-PEG-scFv2。

[0130] 其它多特异性抗体形式已在例如Brinkmann和Kontermann, *The making of bispecific antibodies*, *mAbs*, 9:2, 182-212 (2017) 中, 特别是在图2中描述, 例如串联 scFv、三聚体、Fab-VHH、taFv-Fc、scFv₄-Ig、scFv₂-Fcab、scFv₄-IgG。例如在W099/37791中公开了双抗体、三抗体及其生产方法。

[0131] 用于本发明的抗体的实例包括有附加的IgG和有附加的Fab, 其中完整的IgG或Fab片段分别通过向所述IgG或Fab的重链和/或轻链的N末端和/或C末端附加至少一个额外的抗原结合结构域(例如两个、三个或四个额外的抗原结合结构域)、例如单结构域抗体(诸如VH或VL或VHH)、scFv、dsscFv、dsFv来进行工程化, 例如如W02009/040562、W02010/035012、W02011/030107、W02011/061492、W02011/061246和W02011/086091中所描述的。特别地, 在W02009/040562中描述了Fab-Fv形式, 在W02010/035012中描述了其二硫化物稳定化的形式Fab-dsFv。W02014/096390中描述了单接头Fab-dsFv, 其中dsFv通过Fv的VL或VH结构域与Fab的LC或HC的C末端之间的单个接头连接到Fab。W02015/197789中描述了有附加的IgG, 其包含通过将dsFv附加到IgG重链或轻链的C末端而工程化改造的全长IgG1。

[0132] 用于本发明的另一个示例性抗体包含与两个scFv或dsscFv连接的Fab, 每个scFv或dsscFv结合相同或不同的靶标(例如, 一个scFv或dsscFv结合治疗性靶标, 一个scFv或dsscFv通过结合例如白蛋白而增加半衰期)。W02015/197772中描述了此类抗体。用于本发明片段的另一个示例性抗体包含仅与一种scFv或dsscFv连接的Fab, 如例如W02013/068571和Dave等人, *Mabs*, 8(7) 1319-1335 (2016) 中所描述的。

[0133] 多特异性抗体的其它公知形式包括:

[0134] 本文所用的双抗体是指两个Fv对, 第一VH/VL对和另一VH/VL对, 它们具有两个Fv间接头, 使得第一Fv的VH与第二Fv的VL连接以及第一Fv的VL与第二Fv的VH连接

[0135] 本文使用的三抗体是指包含三个Fv和三个Fv间接头的类似于双抗体的形式。

[0136] 本文使用的四抗体是指包含四个Fv和四个Fv间接头的类似于双抗体的形式。

[0137] 本文使用的串联scFv是指通过单个接头连接(使得存在单个Fv间接头)的至少两个scFv。

[0138] 本文所用的串联scFv-Fc是指至少两个串联scFv, 其中每个scFv例如通过铰链附加到恒定区片段-CH2CH3的CH2结构域的N末端。

[0139] 本文使用的Fab-Fv是指可变区附加到以下每个的C末端的Fv片段: 重链的CH1和轻链的CL。该形式可以作为其PEG化的形式提供。

[0140] 本文使用的Fab'-Fv类似于FabFv, 其中Fab部分被Fab' 替代。该形式可以作为其PEG化的形式提供。

[0141] 本文使用的Fab-dsFv是指其中Fv内二硫键稳定附加的C-末端可变区的FabFv。所述形式可以作为其PEG化形式提供。

[0142] 本文采用的Fab-scFv是轻链或重链的C末端附加有scFv的Fab分子。

[0143] 本文使用的Fab'-scFv是在轻链或重链的C末端附加了scFv的Fab' 分子。

[0144] 本文使用的DiFab是指通过其重链的C末端连接的两个Fab分子。

[0145] 本文使用的DiFab' 是指在其铰链区通过一个或多个二硫键连接的两个Fab' 分子。

[0146] 如本文中所示, scdiabody是这样的双抗体, 其包含Fv内接头使得分子包含三个接头并形成正常的scFv, 其VH和VL末端各自连接到另一Fv对的可变区之一。

[0147] 本文使用的Scdiabody-Fc是两个Scdiabody,其中每个scdiabody例如通过铰链附加到恒定区片段-CH2CH3的CH2结构域的N末端。

[0148] 本文使用的scFv-Fc-scFv是指四个ScFv,其中各有一个ScFv被附加到-CH2CH3片段的轻链和重链的N-末端和C-末端。

[0149] 本文使用的Scdiabody-CH3是指各自例如通过铰链连接到CH3结构域的两个Scdiabody分子。

[0150] 本文使用的IgG-scFv是在每条重链或每条轻链的C末端上具有scFv的全长抗体。

[0151] 本文使用的scFv-IgG是在每条重链或每条轻链的N-末端上具有scFv的全长抗体。

[0152] 本文使用的V-IgG是在每条重链或每条轻链的N末端上具有可变结构域的全长抗体。

[0153] 本文使用的IgG-V是在每条重链或每条轻链的C末端上具有可变结构域的全长抗体。

[0154] DVD-Ig(也称为双V结构域IgG)是在每条重链或每条轻链的N末端上具有4个额外的可变结构域的全长抗体。

[0155] 本公开提供了多特异性抗体,其包含一个特异性结合HLA-G的结合结构域,所述结合结构域包含:

[0156] a.轻链可变区,其包含:

[0157] 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1,

[0158] 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2,和

[0159] 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及

[0160] b.重链可变区,其包含:

[0161] 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1,

[0162] 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2,和

[0163] 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0164] 本发明的抗体特异性地(或选择性地)结合HLA-G。当抗体优先或以高亲和力与目标蛋白质(例如HLA-G)结合、但基本上不与其它蛋白质结合时,则所述抗体“特异性地”结合所述蛋白质。换句话说,抗体与目标蛋白质结合,而与任何其它分子没有显著的交叉反应性。抗体的特异性可通过确定抗体是否与上述其它相关蛋白结合或抗体是否能区分它们来进一步研究。

[0165] 特别地,“特异性结合”HLA-G的抗体不会与另一种人蛋白(特别是另一种HLA-I分子)发生交叉反应。在一个实施方案中,本发明的抗体基本上不与HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E和HLA-F中的任一种结合。在一个实施方案中,本发明的抗体不与HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E和HLA-F中的任一种结合。HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E和HLA-F的示例性序列分别为SEQ ID NO:132、134、136、138和140。在一个实施方案中,本发明的抗体不结合B2m。

[0166] 本发明的抗体可以特异性结合HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域。“特异性结合HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域”,将被理解为抗体结合HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域,而与另一种人蛋白没有交叉反应性,并且与HLA-G的另一个结构域(例如 $\alpha 1$ 或 $\alpha 2$ 结构域)没有交叉反应性。

[0167] 交叉反应性可以例如通过本文所述的任何合适的方法来评估。如果抗体可以以与另一种分子的结合强度至少约为其与目标蛋白的结合强度的5%、10%、15%、20%、25%、

30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或100%，则可认为抗体的交叉反应性显著。特异性(或选择性)抗体可以以低于其与目标蛋白结合的强度的约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%的强度结合另一种分子。抗体可以以其与目标蛋白的结合强度的低于约20%、低于约10%、低于约10%或低于约5%、低于约2%或低于约1%的强度结合所述另一种分子。

[0168] 在一个实施方案中,根据本发明,抗体与HLA-G的结合的特征在于解离常数(K_D)小于20nM,特别是小于15nM,特别是小于10nM,特别是小于9nM,特别是小于8nM,特别是小于7nM,特别是小于6nM,特别是小于5nM。

[0169] 本文使用的术语“ K_D ”是指平衡解离常数,其由 K_d 与 K_a 的比率(即 K_d/K_a)获得,并以摩尔浓度(M)表示。 K_d 和 K_a 分别指特定抗原-抗体(或其抗原结合片段)相互作用的解离速率和缔合速率。抗体的 K_D 值可使用本领域中已确立的方法来测定。测定抗体的 K_D 的方法是通过使用表面等离子体共振(SPR),诸如本文实施例中描述的 **Biacore®** 系统,使用重组HLA-G或其合适的融合蛋白/多肽。通常,通过SPR在25°C的温度下测定 K_D 值。在一个实例中,使用重组HLA-G细胞外结构域(ECD)测量亲和力,所述结构域已经如本文实施例中所述与B2m以复合物形式表达。对于表面等离子体共振,将靶分子固定在固相上,并暴露于沿流动池流动的流动相中的配体。如果配体与固定的靶标发生结合,则局部折射率会发生变化,导致SPR角的变化,这可通过检测反射光强度的变化来实时监测。可以分析SPR信号的变化速率,以产生结合反应的缔合和解离阶段的表观速率常数。这些值的比率给出了表观平衡常数(亲和力)(参见例如Wolff等人,Cancer Res.53:2560-65(1993))。

[0170] 术语“亲和力”是指抗体与HLA-G之间相互作用的强度。

[0171] 可针对与B2m缔合或未与之缔合的HLA-G或HLA-G ECD测量对HLA-G的结合亲和力。例如,与HLA-G的结合可通过测量对包含序列SEQ ID NO:108或110的可溶性HLA-G ECD的结合亲和力来评估。在一个实例中,通过测量对与B2m缔合的可溶性HLA-G ECD(例如包含序列SEQ ID NO:108或110)的结合亲和力来评估与HLA-G的结合。在一个实施方案中,本发明的抗体以小于20nM,特别是小于15nM,特别是小于10nM,特别是小于9nM,特别是小于8nM,特别是小于7nM,特别是小于6nM,特别是小于5nM的解离常数(K_D)结合HLA-G的ECD。在一个实施方案中,在25°C的温度下,通过SPR测定表达为全长抗体的本发明的抗体与HLA-G的单体形式之间(例如与B2m缔合的HLA-G ECD)的解离常数。在一个实施方案中,如实施例7.1中所述,通过SPR测定解离常数。

[0172] 在另一个实例中,与HLA-G的结合可通过测量对包含序列SEQ ID NO:107的细胞膜表达的HLA-G的结合亲和力来评估。可通过FACS分析与细胞膜表达的HLA-G的结合。通常,在细胞表面表达的HLA-G以二聚体形式表达。在一个实施方案中,如通过FACS所测定的,本发明的抗体与细胞上的HLA-G结合,其中解离常数(K_D)小于2nM,优选小于1nM。在一个实施方案中,如通过FACS所测定的,本发明的抗体以小于1nM的解离常数(K_D)与JEG3细胞结合。

[0173] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体,其包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDR-L1、含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;并且其中重链可变区包含含有SEQ ID NO:4的CDR-H1、含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和含有SEQ ID NO:6的CDR-H3;并且其中所述抗体的解离常数(K_D)小于20nM,特别是小于15nM,特别是小于10nM,特别是小于9nM,特别是小于8nM,特别是小于

7nM,特别是小于6nM,或特别是小于5nM。在一个实施方案中,通过SPR在25°C下测定表达为全长抗体的本发明的抗体与HLA-G的单体形式之间的解离常数。

[0174] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体,其包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDR-L1、含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;并且其中重链可变区包含含有SEQ ID NO:4的CDR-H1、含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和含有SEQ ID NO:6的CDR-H3;并且其中表达为全长抗体的抗体以如通过FACS所测定的小于2nM,优选小于1nM的解离常数(K_D)与JEG3细胞结合。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的抗体是阻断抗体。抗体上下文中的术语“阻断(blocking)”(或“阻断(blocks)”)描述了能够抑制或减弱其靶标(HLA-G)与其受体结合的抗体。在一个实施方案中,本发明的抗体阻断了HLA-G与ILT2之间的相互作用。在一个实施方案中,本发明的抗体阻断了HLA-G与ILT4之间的相互作用。在一个实施方案中,本发明的抗体阻断了HLA-G与ILT2之间以及HLA-G与ILT4之间的相互作用。在一个实施方案中,当HLA-G表达为单体和/或二聚体和/或三聚体时,本发明的抗体阻断HLA-G与ILT2之间和/或HLA-G与ILT4之间的相互作用。

[0176] 阻断HLA-G与ILT2和/或ILT4的结合可以通过测量与B2m缔合或不与之缔合的在细胞表面表达的HLA-G的胞外结构域(ECD)与ILT2和/或ILT4(例如表达为融合蛋白,诸如Fc融合蛋白(ITT2-Fc、ILT4-Fc))之间的相互作用的阻断来评估。可使用ILT2-兔Fc融合蛋白,其包含例如SEQ ID NO:142。可使用ILT4-兔Fc融合蛋白,其包含例如SEQ ID NO:144。可如实施例8所述评估阻断HLA-G与ILT2和/或ILT4的结合。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的抗体不阻断HLA-G与B2m之间的缔合。在一些实施方案中,本发明的抗体不阻断HLA-G与其关联肽之间的缔合,所述关联肽与HLA-G以复合物形式天然表达。

[0178] 在一些实施方案中,本发明的抗体抑制HLA-G的多聚化。在一些实施方案中,本发明的抗体抑制HLA-G的二聚化。在一些实施方案中,本发明的抗体抑制HLA-G的三聚化。

[0179] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体阻断ILT2与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于50pM,优选地,根据本发明的抗体阻断ILT2与在JEG3细胞表面天然表达的HLA-G的结合的 IC_{50} 小于40pM、或小于30pM、或小于20pM,如例如实施例8所述使用利用大体积反应的体外测定所测定的。在一个优选实施方案中,根据本发明的抗体阻断ILT2与在JEG3细胞表面天然表达的HLA-G的结合的 IC_{50} 小于20pM。在一个实施方案中,ILT2被表达为ILT2-兔Fc融合蛋白,其包含例如SEQ ID NO:142。在一个实施方案中,根据本发明的抗体阻断ILT4与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于1800pM。优选地,根据本发明的抗体在本文所述的体外测定中阻断ILT4与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于1500pM或小于1400pM。在一个实施方案中,ILT4被表达为ILT4-兔Fc融合蛋白,其包含例如SEQ ID NO:144。可以如实施例8所述评估阻断HLA-G与ILT4的结合。

[0180] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体,其包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含含有SEQ ID NO:1的CDR-L1、含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;并且其中重链可变区包含含有SEQ ID NO:4的CDR-H1、含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和含有SEQ ID NO:6的CDR-H3;并且其中所述抗体:

[0181] a. 如例如实施例8所述使用利用大体积反应的体外测定所测定的,阻断ILT2与在JEG3细胞表面天然表达的HLA-G的结合的 IC_{50} 小于20pM;和/或

[0182] b. 如例如实施例8所述测定的, 阻断ILT4与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于1400pM。

[0183] 本文所用的术语 IC_{50} 是指半最大抑制浓度, 其是物质 (诸如抗体) 在抑制特定生物或生化功能的有效性的量度, 在本发明中, 其是ILT2或ILT4与HLA-G的结合活性。 IC_{50} 是定量量度, 表明需要多少特定物质才能将给定的生物过程或功能或活性抑制一半。

[0184] 在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的免疫抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体通过阻断HLA-G与ILT2之间的相互作用和/或HLA-G与ILT4之间的相互作用来抑制HLA-G介导的免疫抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对NK细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对细胞毒性T淋巴细胞 (诸如CD8+T淋巴细胞和/或CD4+T淋巴细胞) 的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对调节性T淋巴细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对B细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对单核细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对巨噬细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对树突细胞的抑制功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对嗜中性粒细胞的抑制。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制HLA-G介导的对吞噬作用的抑制。

[0185] 在一些实施方案中, 本发明的抗体诱导促炎细胞因子诸如 $TNF\alpha$ 、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 (也称为IL-12p70)、IL-13、IL-15、IL-18、IFN γ 、GM-CSF、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、 $TNF\alpha$ 的产生。在一些实施方案中, 本发明的抗体促进免疫细胞 (单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、T细胞或NK细胞) 募集到肿瘤微环境中。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制表达HLA-G的肿瘤细胞上的HLA-G功能。在一些实施方案中, 本发明的抗体诱导髓样细胞的活化。在一些实施方案中, 本发明的抗体诱导肿瘤细胞杀伤 (例如通过ADCC或CDC)。在一些实施方案中, 本发明的抗体诱导肿瘤细胞吞噬作用, 例如ADCP。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制血管生成。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制肿瘤细胞转移。在一些实施方案中, 本发明的抗体抑制肿瘤细胞增殖。

[0186] 在一个实施方案中, 本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体, 其包含:

[0187] a. 轻链可变区, 其包含:

[0188] 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1,

[0189] 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2, 和

[0190] 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3; 以及

[0191] b. 重链可变区, 其包含:

[0192] 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1,

[0193] 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2, 和

[0194] 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3,

[0195] 其中所述抗体阻断HLA-G与ILT2和/或ILT4的结合 (优选与ILT2和ILT4的结合), 并且其中所述抗体对于HLA-G的解离常数 (KD) 具有小于10nM。在一个实施方案中, 通过SPR在25°C的温度下使用本发明的全长抗体来测定KD值。在一个实施方案中, 针对HLA-G的单体形式测定解离常数。

[0196] 一个实施方案中, 本发明提供了特异性结合HLA-G的抗体, 其包含:

[0197] a. 轻链可变区, 其包含:

- [0198] 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1,
- [0199] 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2,和
- [0200] 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及
- [0201] b. 重链可变区,其包含:
- [0202] 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1,
- [0203] 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2,和
- [0204] 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3,
- [0205] 其中所述抗体抑制至少一种如上所述的HLA-G介导的免疫抑制功能。
- [0206] 用于本发明的抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。
- [0207] 在一个实施方案中,所述抗体是嵌合的。术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的可变结构域(或至少其一部分)源自特定来源或物种,例如小鼠、大鼠、兔等,而重链和/或轻链的其余部分(即恒定区)源自另一物种诸如人。(Morrison;PNAS 81,6851 (1984))。嵌合抗体由源自两个不同物种的元件组成,使得元件保留了其来源物种的特征。“嵌合抗体”的子类别是“人源化抗体”。
- [0208] 嵌合抗体通常使用重组DNA方法生产。可通过用人L和H链恒定区的编码序列替换相应的非人(例如鼠或兔)H和L恒定区来修饰DNA。
- [0209] 人源化抗体(包括CDR移植抗体)是具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区的抗体分子(参见,例如US 5,585,089;W091/09967)。应当理解,可能只需要转移CDR的特异性决定残基而不是整个CDR(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。人源化抗体可以任选地进一步包含一个或多个源自CDR所来源的非人物种的框架残基。
- [0210] 完全人抗体是指其中重链和轻链的可变区和恒定区(当存在时)都是人来源的,或者与人来源的序列基本相同,但不一定来自同一抗体的抗体。完全人抗体的实例可包括例如通过上述噬菌体展示方法产生的抗体和由小鼠产生的抗体,在所述小鼠中鼠免疫球蛋白可变区基因和任选的恒定区基因已被其人对对应物替代,例如在EP 0546073、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US 5,770,429、EP 0438474和EP 0463151中概括描述的。
- [0211] 在一个实施方案中,抗体是人抗体。人抗体包含重链或轻链可变区或全长重链或轻链,如果抗体的可变区或全长链获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统,则它们是特定种系序列的“产物”或“源自”特定种系序列。此类系统包括用目标抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或用目标抗原筛选噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。通过将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较,并选择在序列上最接近(即,最大同一性%)人抗体序列的人种系免疫球蛋白序列,可以鉴定作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体或其片段。作为特定人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”其的人抗体与种系序列相比可含有氨基酸差异,这是由于例如天然发生的体细胞突变或定点突变的有意引入而导致的。然而,选定的人抗体通常在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90%相同,并且当与其它物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)比较时,包含将人抗体鉴定为是人抗体的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体可以在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的

氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%或至少95%，或者甚至至少96%、97%、98%或99%相同。通常，源自特定人种系序列的人抗体将展示不超过10个氨基酸的与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的差异。在某些情况下，人抗体可展示不超过5个、或甚至不超过4个、3个、2个或1个氨基酸的与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的差异。

[0212] 人抗体可通过本领域技术人员已知的多种方法产生。人抗体可使用人骨髓瘤或小鼠-人异源骨髓瘤细胞系通过杂交瘤方法制备 (Kozbor, *J Immunol*; (1984) 133:3001; Brodeur, *Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63页, Marcel Dekker Inc, 1987)。替代方法包括噬菌体文库或转基因小鼠 (其两者都利用人可变区库) 的使用 (Winter G; (1994) *Annu Rev Immunol* 12:433-455, Green LL, (1999) *J Immunol Methods* 231:1 1-23)。

[0213] 根据本发明的抗体可使用本领域已知的任何合适的方法获得。HLA-G (包括其融合蛋白、(重组地或天然地) 表达HLA-G的细胞) 可用于产生特异性识别HLA-G的抗体。可使用本文所述的HLA-G的各种形式。

[0214] 在另一个实施方案中,所用的抗原是HLA-G,优选在兔成纤维细胞表面表达,优选如以下实施例所述产生。在一个实施方案中,所用的抗原是与B2m复合的HLA-G,优选在兔成纤维细胞表面表达,优选如以下实施例所述产生。

[0215] 用于免疫宿主的HLA-G或其片段可通过本领域公知的方法从包含表达系统的基因工程宿主细胞制备。HLA-G或其片段在一些情况下可以是较大蛋白质 (诸如例如与亲和标签或类似物融合的融合蛋白) 的一部分。

[0216] 在动物的免疫是必需的情况下,可通过使用公知的常规方案向动物 (优选非人动物) 施用HLA-G或其部分来获得针对HLA-G产生的抗体,参见例如 *Handbook of Experimental Immunology*, D.M.Weir (编辑), 第4卷, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)。可以免疫许多动物,诸如兔子、小鼠、大鼠、羊、牛、骆驼或猪。然而,通常使用小鼠、兔子、猪和大鼠。在一个实施方案中,通过施用在其表面表达HLA-G的大鼠成纤维细胞来获得本发明的抗体。

[0217] 单克隆抗体可通过多种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤法、重组DNA法、噬菌体展示法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法。本文描述了一些制备单克隆抗体的示例性方法。

[0218] 例如,可使用杂交瘤技术 (Kohler&Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497)、三源杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术 (Kozbor等人, 1983, *Immunology Today*, 4:72) 和EBV杂交瘤技术 (Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 第77-96页, Alan R Liss, Inc., 1985) 制备单克隆抗体。

[0219] 用于本发明的抗体也可使用单淋巴细胞抗体方法通过克隆和表达从单淋巴细胞产生的免疫球蛋白可变区cDNA来产生,所述单淋巴细胞被选择用于通过例如由Babcook, J. 等人, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (15):7843-78481; W092/02551; W02004/051268 和国际专利申请号W02004/106377描述的方法产生特异性抗体。

[0220] 单克隆抗体还可使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来产生,并且包括 Brinkman 等人 (在 *J. Immunol. Methods*, 1995, 182:41-50 中)、Ames 等人 (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186)、Kettleborough 等人 (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24:

952-958)、Persic等人(Gene,1997 187 9-18)、Burton等人(Advances in Immunology, 1994,57:191-280)公开的那些。在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆VH基因和VL基因的文库,并将其在噬菌体文库中随机重组,然后可如Winter等人,Ann.Rev.Immunol,12:433-455(1994)中所述筛选其抗原结合噬菌体。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段的形式或以Fab片段的形式展示抗体片段。来自被免疫的来源的文库提供了针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。或者,可如Griffiths等人,EMBO J 12:725-734(1993)所述,克隆(例如,从人中)原始文库以提供针对多种非自身抗原以及自身抗原的单一来源的抗体,而无需任何免疫最后,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol,227:381-388(1992)所述,通过从干细胞中克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3并完成体外重排,也可合成制备原始文库。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:US 5,750,373和US 2005/0079574、US2005/0119455、US2005/0266000、US2007/0117126、US2007/0160598、US2007/0237764、US2007/0292936和US2009/0002360。

[0221] 可使用测量与HLA-G结合的测定和/或测量阻断HLA-G与其受体中的一种或多种受体的结合的能力的测定来进行抗体的筛选。结合测定的一个实例是ELISA,例如,使用固定在平板上的靶多肽的融合蛋白,以及使用缀合的二抗来检测与靶标结合的抗体。阻断测定的一个实例是基于流式细胞术的测定,该测定测量对配体蛋白与靶多肽结合的阻断。荧光标记的二抗用于检测与靶多肽结合的这种配体蛋白的量。

[0222] 可通过筛选具有一种或多种所需活性的抗体的组合文库来分离抗体。例如,本领域已知多种方法可用于筛选具有所需结合特性的抗体的文库。

[0223] 根据本发明的抗体可包含其中产生抗体的动物的框架区。例如,其将包含如上定义的CDR和兔抗体诸如包含根据SEQ ID NO:7的轻链可变区(其核苷酸序列示于SEQ ID NO:8中)和根据SEQ ID NO:11的重链可变区(其核苷酸序列示于SEQ ID NO:12中)的抗体的框架区。

[0224] 在一个优选实施方案中,根据本发明的抗体是人源化的。

[0225] 在一个优选实施方案中,结合HLA-G的抗体(其中抗体是人源化抗体)包含可变轻链和可变重链,其中:

[0226] a.可变轻链包含含有SEQ ID NO:1的CDR-L1、含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及

[0227] b.可变重链包含含有SEQ ID NO:4的CDR-H1、含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0228] 如本文中所用,术语“人源化”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链包含来自供体抗体(例如非人抗体,诸如鼠或兔单克隆抗体)的一个或多个CDR(如果需要,包括一个或多个经修饰的CDR)被移植到受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区框架中。关于综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一个实施方案中,不是转移整个CDR,而是仅将来自上文所述的CDR中的任一种的一个或多个特异性决定残基转移到人抗体框架中(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,仅将来自上文所述一个或多个CDR中的特异性决定残基转移到人抗体框架中。在另一个实施方案中,仅将来自上文所述每一个CDR中的特异性决定残基转移到人抗体框架中。

[0229] 当移植CDR时,考虑到CDR所来源的供体抗体的种类/类型,可以使用任何合适的受体可变区框架序列,包括小鼠、灵长类动物和人的框架区。

[0230] 优选地,根据本发明的人源化抗体具有包含人受体框架区以及一个或多个本文中特别地提供的CDR的可变结构域。因此,在一个实施方案中,提供了结合HLA-G的人源化抗体,其中可变结构域包含人受体框架区和非人供体CDR。

[0231] 可用于本发明的人框架的实例是KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM(Kabat等人,同上)。例如,KOL和NEWM可用于重链,REI可用于轻链,EU、LAY和POM可用于重链和轻链。或者,可使用人种系序列;这些可在<http://www.imgt.org/>上获得。

[0232] 在根据本发明的一种人源化抗体中,受体重链和轻链不一定需要来源于相同的抗体,如果需要,可以包含具有源自不同链的框架区的复合链。

[0233] 根据本发明的人源化抗体的轻链的合适框架区源自具有SEQ ID NO:103的人种系IGKV1D-13IGKJ4,其核苷酸序列示于SEQ ID NO:104中。

[0234] 根据本发明的人源化抗体的重链的合适框架区源自具有SEQ ID NO:105中所示的序列的人种系IGHV3-66 IGHJ4,其核苷酸序列示于SEQ ID NO:106中。

[0235] 因此,在一个实施方案中,提供了结合HLA-G的人源化抗体,其中该抗体包含轻链可变区和重链可变区,并且其中:

[0236] a.轻链可变区包含:

[0237] i.含有SEQ ID NO:1的CDR-L1;和

[0238] ii.含有SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0239] iii.含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及

[0240] b.重链可变区包含:

[0241] i.含有SEQ ID NO:4的CDR-H1;和

[0242] ii.含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和

[0243] iii.含有SEQ ID NO:6的CDR-H3;并且

[0244] 其中轻链构架区源自包含SEQ ID NO:103的人种系IGKV1D-13IGKJ4;重链构架区源自包含SEQ ID NO:105的人种系IGHV3-66IGHJ4。

[0245] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0246] a.含有SEQ ID NO:19或15或23的轻链可变区;和/或

[0247] b.含有SEQ ID NO:93、27、33、57、69、75、81或87的重链可变区。

[0248] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:93的重链可变区。

[0249] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:15的轻链可变区和含有SEQ ID NO:27的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:27的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:23的轻链可变区和含有SEQ ID NO:27的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:33的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:57的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:69的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19

的轻链可变区和含有SEQ ID NO:75的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:81的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:87的重链可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:23的轻链可变区和含有SEQ ID NO:93的重链可变区。

[0250] 在一个实施方案中,本发明的抗体是IgG1。在一个实施方案中,本发明的抗体是IgG1并且包含:

[0251] a. 含有SEQ ID NO:21或17或25的轻链;和/或

[0252] b. 含有SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89的重链。

[0253] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链。

[0254] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:17的轻链和含有SEQ ID NO:29的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:29的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:25的轻链和含有SEQ ID NO:29的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:35的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:59的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:71的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:77的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:83的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:89的重链。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:25的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链。

[0255] 有利的是,IgG1包含活性Fc片段,即具有Fc介导的效应子功能。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体包含Fc介导的效应子功能。

[0256] 术语“效应子功能”是指归功于抗体Fc区的那些生物活性,所述生物活性随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

[0257] 术语“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指一种诱导细胞死亡的机制,其中靶标结合的抗体的Fc效应结构域结合并激活补体成分C1q,所述补体成分C1q转而激活补体级联反应,导致靶细胞死亡。

[0258] 术语“抗体依赖性细胞毒性”或“ADCC”是一种诱导细胞死亡的机制,其依赖于抗体包被的靶细胞与具有裂解活性的效应细胞(诸如天然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞)通过效应细胞上表达的Fc γ 受体(Fc γ R)的相互作用。

[0259] 术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”或“ADCP”是一种诱导吞噬作用的机制,其依赖于抗体包被的靶细胞或抗体包被的可溶性靶标与具有吞噬活性的效应细胞(诸如巨噬细胞和中性粒细胞)通过效应细胞上表达的Fc γ 受体(Fc γ R)的相互作用。

[0260] 如实施例所述,研究了HLA-G在正常、非肿瘤组织中的表达模式,并且有利地发现包含由本发明抗体结合的表位的HLA-G的形式在健康组织中、特别是在胰腺和垂体组织中不表达。

[0261] 这与文献中先前报道的相反,文献中Cirluli等人(Cirlulli等人,DIABETES,第55卷,2006年5月)报道了胰岛中HLA-G蛋白的表达;他们在支持细胞复制的细胞外基质上培养的胰岛细胞中观察到HLA-G的显著上调。此外,例如,Boegel等人(Boegel等人,BMC Medical Genomics(2018)11:36)报道了垂体以及胰岛和睾丸中HLA-G的基因表达。

[0262] 因此,本文实施例中描述的结果是令人惊讶的,并且表明与现有技术的教导所预期的相反,能够杀死表达HLA-G的细胞(例如通过Fc介导的效应子功能)的针对HLA-G的抗体代表了治疗实体瘤的潜在候选物,并且预期不会通过与正常组织结合而对患者产生毒性。另外,包含活性Fc的抗体可以促进效应细胞在肿瘤微环境(TME)中的募集和活化,另外,直接杀死HLA-G+肿瘤细胞可以诱导肿瘤抗原释放到局部环境中,从而进一步刺激免疫反应。

[0263] 如本文所述的这种抗体的双重机制(能够阻断HLA-G与其抑制性受体之间的相互作用,并能够杀死细胞)对于治疗HLA-G上调(诸如在实体瘤中)的患者表现出相当大的优势。

[0264] 另外,肿瘤异质性表明,每种机制(促进免疫细胞活化的HLA-G阻断,以及通过活性Fc依赖性机制的直接肿瘤细胞杀死)的重要性可因患者而异。因此,通过在具有不同特征(例如不同的HLA-G表达模式)的肿瘤中使用不同机制的能力,多种肿瘤细胞杀伤机制可以使更广泛的患者受益。

[0265] 选择本发明的HLA-G抗体的方法

[0266] 由于与针对HLA-G的抗体的生产相关的特殊挑战(诸如与其它HLA-I的高度同源性,能够阻断HLA-G与其抑制性受体之间的相互作用的抗体的鉴定)以及为了鉴定可用于治疗的抗体,必须开发特殊的发现、筛选和测试策略,包括与HLA-G的结合的测量,结合的亲和力和特异性(与其它HLA-I没有交叉反应性)的评估,以及对结合的结构方面(靶表位残基)的高通量测量。

[0267] 因此,提供了根据本发明鉴定抗体的方法,所述方法包括:

[0268] a) 用HLA-G免疫原性组合物免疫非人哺乳动物;

[0269] b) 从所述非人哺乳动物中回收B细胞;

[0270] c) 选择由所述B细胞产生的具有以下特性的抗体:

[0271] i. 与HLA-G结合的亲和力以解离常数 K_D 表示小于20nM;

[0272] 以及

[0273] ii. 不与除HLA-G外的HLA-I结合;以及

[0274] iii. 阻断HLA-G与ILT2之间和/或HLA-G与ILT4之间的结合。

[0275] 步骤a)

[0276] “免疫原性组合物”是指能够在施用了所述组合物的非人哺乳动物中产生免疫反应的组合物。免疫原性组合物通常允许在施用过免疫原性组合物的哺乳动物中表达目标免疫原性抗原,针对该抗原的抗体可作为免疫反应的一部分而产生。“HLA-G免疫原性组合物”是指能够在施用了所述组合物的哺乳动物中产生针对HLA-G的免疫反应的组合物。

[0277] “蛋白质免疫接种”是指施用包含目标抗原的免疫原性蛋白或所述蛋白的免疫原性部分(包含所述目标抗原或其免疫原性部分)的技术。

[0278] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含全长蛋白。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含蛋白的免疫原性部分。例如,在一个实施方案中,免疫原性组合物包含与B2m

复合的全长HLA-G。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含在B2m不存在的情况下包含全长HLA-G。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含与B2m缔合或不与之缔合的HLA-G的免疫原性部分。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含与B2m复合的HLA-G的胞外结构域。在另一个实施方案中,免疫原性组合物在B2m不存在的情况下包含HLA-G的胞外结构域。

[0279] “DNA免疫接种”是指将编码包含目标抗原的全长蛋白或其免疫原性部分的基因工程核酸分子(在本文中也称为核酸疫苗或DNA疫苗)直接施用到哺乳动物细胞中,以在所述细胞中产生针对所述目标抗原的免疫反应的技术。DNA免疫接种使用宿主细胞机制来表达对应于所施用的核酸分子的一种或多种肽和/或实现预期效果,特别是在细胞水平上的抗原表达,以及此外在细胞水平上或在宿主生物体内的一种或多种免疫治疗效果。

[0280] “细胞免疫接种”是指施用天然表达或转染有包含目标抗原的免疫原性蛋白或所述蛋白的免疫原性部分的细胞的技术,所述蛋白包含所述目标抗原或其免疫原性部分。在一个实施方案中,步骤a)中的免疫接种使用用包含目标抗原的免疫原性蛋白或所述蛋白的免疫原性部分转染的成纤维细胞进行的细胞免疫接种来进行,所述蛋白包含所述目标抗原或其免疫原性部分。

[0281] “免疫原性部分”是指目标蛋白或抗原的一部分,其保留了在施用有所述目标蛋白或抗原的部分或编码其的DNA的非人哺乳动物中诱导免疫反应,以使得能够产生本发明的抗体的能力。

[0282] HLA-G(包括其融合蛋白)、(重组或天然地)表达HLA-G的细胞可用于产生特异性识别HLA-G的抗体。可使用本文所述的HLA-G的各种形式。

[0283] 用于免疫宿主的HLA-G或其片段可通过本领域公知的方法从包含表达系统的基因工程宿主细胞中制备,或者可从天然生物来源中回收它们。HLA-G或其片段在一些情况下可以是较大蛋白质(诸如例如与亲和标签或类似物融合的融合蛋白)的一部分。

[0284] 在一个实施方案中,免疫接种步骤可使用蛋白质免疫接种、DNA免疫接种或细胞免疫接种或其任意组合来进行。

[0285] 在一个实施方案中,非人哺乳动物是小鼠。在一个实施方案中,非人哺乳动物是大鼠。在一个实施方案中,非人哺乳动物是兔子。在一个实施方案中,兔子是新西兰白兔。在一个实施方案中,通过皮下注射免疫原性组合物来免疫哺乳动物。在一个实施方案中,免疫原性组合物包含在细胞表面瞬时表达HLA-G的兔成纤维细胞。在一个实例中,兔成纤维细胞已经用编码HLA-G的DNA序列转染,所述DNA序列包含SEQ ID NO:111。在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含在细胞表面瞬时共表达HLA-G和B2m的兔成纤维细胞。在一个实施方案中,兔成纤维细胞是Rab9兔成纤维细胞。

[0286] 免疫接种步骤可使用初免-加强免疫接种方案来进行,该方案意指免疫原性组合物的第一次施用(初次免疫接种或初次施用),然后至少一次在免疫接种方案过程中与第一次施用在时间上分开的进一步施用(加强免疫接种或加强施用)。加强免疫接种包括一次、两次、三次或更多次施用。在一个实施方案中,加强免疫接种包括以14天的间隔施用两次免疫原性组合物。在一个实施方案中,免疫接种步骤包括第一次施用在细胞表面瞬时表达HLA-G的兔成纤维细胞,随后以14天的间隔进行两次加强免疫接种。在一个实施方案中,兔成纤维细胞是Rab9兔成纤维细胞。

[0287] 在一个实施方案中,初次免疫接种包括佐剂的施用。在一个实施方案中,在不同于

免疫原性组合物注射部位的部位施用佐剂。在一个实施方案中,佐剂是弗氏佐剂。在一个实施方案中,初次免疫接种和加强免疫接种都包括施用佐剂诸如弗氏佐剂。

[0288] 在一个实施方案中,免疫接种步骤包括在第一佐剂存在的情况下进行的初次免疫接种,然后在第二佐剂存在的情况下进行的至少一次加强免疫接种。

[0289] 在一个实施方案中,将免疫原性组合物通过皮下注射例如施用到肩部中。

[0290] “佐剂”是指免疫刺激剂。佐剂是本领域公知的物质。作为免疫刺激剂或抗原递送系统或两者兼有的常规佐剂涵盖例如明矾、多糖、脂质体、基于生物可降解聚合物的纳米颗粒、脂多糖。例如,佐剂可以是弗氏佐剂、Montanide佐剂或Fama佐剂。

[0291] 步骤b)

[0292] 分离B细胞的方法是公知的,通常包括从PBMC(外周血单核细胞)、骨髓或从次级淋巴器官,即从淋巴结或脾中分离B细胞。在一个实施方案中,在免疫步骤a)后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天进行抗原特异性记忆B细胞的分离。在一个实施方案中,分离B细胞在免疫接种步骤a)后14天进行。在一个实施方案中,步骤b)包括通过流式细胞术分选抗原特异性B细胞。

[0293] 步骤c)

[0294] 步骤c)中的筛选步骤可以根据例如本公开中描述的用于测量结合和阻断活性的方法来进行。

[0295] i. 与HLA-G结合的亲和力以解离常数(K_D)表示小于20nM

[0296] 可针对可溶性和/或膜结合的HLA-G来测定结合。可通过使用表面等离子体共振(诸如例如在实施例中描述的**Biacore®**系统)来测定与HLA-G的结合。在一个实例中,如本文实施例中所述,针对与B2m复合的重组HLA-G ECD通过Biacore来测量亲和力,可选择 K_D 小于20nM的抗体进行进一步分析。在一个实例中,通过SPR在25°C的温度下在表达为全长抗体的抗体与HLA-G的单体形式之间测定解离常数 K_D 。

[0297] 可选地,或此外,可针对表达HLA-G的细胞(诸如转染有HLA-G和B2m的HEK293或天然表达HLA-G的JEG3细胞)通过FACS来测定与HLA-G的结合。在本文所述的实施例中提供了通过FACS测量抗体对HLA-G的亲和力的方法。

[0298] 有利的是,可针对可溶性HLA-G和细胞表达的HLA-G两者使用结合测定来筛选抗体。

[0299] ii. 不与除HLA-G外的HLA-I结合

[0300] 特殊的筛选策略已被开发来评估结合的特异性,即不存在与其它HLA-I的交叉反应性,这涉及HLA-G构建体变体的产生,其中对HLA-G特异的氨基酸已被在其它HLA-I中发现的共有氨基酸所取代(“HLA-G构建体”)。实施例1中描述的HLA-G null构建体对于筛选HLA-G特异性抗体可以是特别有用的。

[0301] “HLA-G null 1,2,3”对应于HLA-G变体,其中在HLA-G α 1、 α 2和 α 3上特异性表达的氨基酸被在其它HLA-I上表达的共有氨基酸取代(20个氨基酸突变)。

[0302] 在一个实施方案中,根据本发明鉴定抗体的方法包括针对“HLA-G null 1,2,3”筛选步骤b)后回收的抗体,并选择未检测到结合的抗体。可针对在细胞表面表达的“HLA-G null 1,2,3”(例如包含SEQ ID NO:115)或针对可溶性“HLA-G null 1,2,3”(ECD)(例如包

含SEQ ID NO:113中)进行筛选。

[0303] 可根据实施例中描述的方法进一步评估与其它HLA-I的结合。HEK293细胞可用编码HLA-A、B、C、E或F的DNA序列(例如分别包含SEQ ID NO:131、133、135、137和139的DNA序列)和B2m(例如包含SEQ ID NO:130的DNA序列)转染HEK293细胞。可通过FACS评估与细胞表达的HLA-I的结合。

[0304] iii. 阻断HLA-G与ILT2之间和/或HLA-G与ILT4之间的结合

[0305] 阻断HLA-G与ILT2和/或ILT4的结合可通过测量在细胞表面表达的与B2m缔合的HLA-G(例如在JEG3细胞表面天然表达的,或如实施例中所述在HCT116细胞表面瞬时表达的)与ILT2和/或ILT4(例如作为融合蛋白诸如Fc融合蛋白(ITT2-Fc、ILT4-Fc)表达的)之间的相互作用的阻断来评估。

[0306] 在步骤c)后选择的具有所需特性的抗体可基于额外的测定进一步表征和区分,所述测定包括例如特异性测定、ADCC、ADCP、CDC、生物物理和稳定性测定,以及调节免疫环境和在离体培养人原发性肿瘤中诱导肿瘤细胞杀伤的能力,诸如本文实施例中所述的方法。

[0307] 表位

[0308] 在本发明中,术语“表位”可互换地用于构象表位和线性表位。构象表位由抗原的氨基酸一级序列的不连续部分组成,而线性表位由连续氨基酸形成的序列组成。

[0309] 在一个实施方案中,本发明的抗体特异性结合HLA-G α 3结构域。在一个实施方案中,本发明的抗体结合包含残基F195和Y197(参考SEQ ID NO:107)的HLA-G的表位。

[0310] 在一些实施方案中,本发明的抗体结合HLA-G上的表位,所述表位包含残基V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257(其中编号根据SEQ ID NO:107)。

[0311] 在一个实施方案中,本发明的抗体不结合B2m。因此,有利的是,本发明的抗体结合与B2m复合的HLA-G或在B2m不存在的情况下与HLA-G结合。在一个实施方案中,本发明的抗体与HLA-G关联肽(与HLA-G以复合物形式天然表达的)在HLA-G上不结合相同的结合部位。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体不阻断HLA-G与其关联肽(与HLA-G以复合物形式天然表达的)之间的缔合。

[0312] 在一个实施方案中,本发明提供了与HLA-G上的表位结合的抗HLA-G抗体,所述表位包含选自由以下组成成的列表的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G(SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。在一个实施方案中,本发明提供了结合HLA-G的表位的人源化IgG1抗体,所述表位包含人HLA-G(SEQ ID NO:107)的残基V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。在一个实施方案中,抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0313] 在一个实施方案中,本发明提供了与HLA-G上的表位结合的抗HLA-G抗体,如在小于**4Å**的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表中的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G(SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。在一个实施方案中,所述抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0314] 在一个实施方案中,本发明提供了结合HLA-G的表位的人源化IgG1抗体,如在小于

4Å的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表中的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G (SEQ ID NO: 107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。在一个实施方案中,抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0315] 在一个实施方案中,本发明提供了结合HLA-G上的表位的人源化IgG1抗体,如在小于**5Å**的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表中的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G (SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、R219、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250、E253和Y257。在一个实施方案中,抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0316] 该表位可通过本领域已知的任何合适的表位作图方法结合本发明提供的任一种抗体来鉴定。此类方法的实例包括筛选源自全长HLA-G的不同长度的肽与本发明的抗体或其片段的结合,并鉴定含有被抗体识别的表位序列的能够特异性结合抗体的最小片段。HLA-G肽可通过合成产生或通过HLA-G的蛋白水解消化产生。结合抗体的肽可通过例如质谱分析来鉴定。诸如X射线晶体学、核磁共振(NMR)光谱或氘交换质谱(HDX-MS)的方法可用于鉴定被抗体结合的表位。通常,当通过X射线晶体学进行表位测定时,距离CDR**4Å**以内的抗原的氨基酸残基被认为是表位的氨基酸残基部分。一旦被鉴定,该表位就可用于制备结合本发明抗体的片段,并且如果需要,用作免疫原以获得结合相同表位的另外的抗体。

[0317] 在描述本发明的方面和实施方案中指出的表位优选是通过X射线晶体学表征的表位。在一个实施方案中,本发明提供了与HLA-G上的表位结合的抗HLA-G抗体,如在小于的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表中的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G (SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257,其中所述表位通过X射线晶体学来表征。

[0318] 在一个实施方案中,本发明提供了结合HLA-G的表位的人源化IgG1抗体,如在小于**4Å**的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G (SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257,其中所述表位通过X射线晶体学来表征。在一个实施方案中,所述抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0319] 在一个实施方案中,本发明提供了结合HLA-G的表位的人源化IgG1抗体,如通过X射线晶体学在小于**5Å**的接触距离下所测定的,所述表位包含选自由以下组成的列表的至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或全部残基:HLA-G (SEQ ID NO:107)的V194、F195、Y197、E198、R219、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250、E253和Y257。在一个实施方案中,所述抗体是无岩藻糖基化的IgG1。

[0320] 另外,HDX-MS和NMR可用于分析溶液中的相互作用,并允许显示通过晶体学测定并不总是明显的变构或构象变化。例如,根据氘孵育30秒时的HDX-MS,鉴定的潜在结合区域为178-MLQRADPPKTHVTHHPVFD-196和214-ILTWQRDGEDQTQDVLE-230。

[0321] 在一个实施方案中,通过NMR确定的表位(随着严格性的增加被定义为超过所有计算的位移的平均值(>0.0764))包含残基T200、L201、L215、W217、R219、D220、E229、A245、

A246、V247、V249、S251、E253、Q255、T258、H260、V261和W274。

[0322] 在一个实施方案中,通过NMR确定的表位(随着严格性的增加被定义为超过所有计算的位移的平均值加一个标准偏差(>0.1597))包含残基H191、Y197、E198、R202、L230、V248、G252、C259和K275。

[0323] 抗体可以与上面根据轻链、重链、轻链可变区、重链可变区或CDR序列定义的抗体竞争结合HLA-G或与所述定义的抗体结合相同的表位。

[0324] 特别地,本发明提供了与包含SEQ ID NO1/2/3/4/5/6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列组合的抗体竞争结合HLA-G或与所述抗体结合相同的表位的抗体。抗体可与分别包含SEQ ID NO:19和93的VL和VH序列对的抗体竞争结合HLA-G,或与所述抗体结合相同的表位。抗体可与包含SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列组合的IgG1竞争结合HLA-G,或与所述IgG1结合相同的表位。抗体可与分别包含SEQ ID NO:19和93的VL和VH序列对的IgG1竞争结合HLA-G,或与所述IgG1结合相同的表位。

[0325] 在一个实施方案中,本发明提供了与包含SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列组合的抗体交叉竞争结合HLA-G的抗体。

[0326] 在本发明的上下文中,本文提供的与根据本发明的参考抗体竞争结合HLA-G或与所述参考抗体结合相同表位的抗体保留了上面部分所述的参考抗体的有利特性,例如对HLA-G的特异性、高亲和力、ILT2和/或ILT4阻断活性。在一个实例中,与根据本发明的参考抗体竞争结合HLA-G或与所述参考抗体结合相同表位的抗体具有:

[0327] a. 例如通过SPR在25°C的温度下所测定的作为全长抗体表达的所述抗体与HLA-G的单体形式之间的解离常数(K_D)小于20nM,特别是小于15nM,特别是小于10nM,特别是小于9nM,特别是小于8nM,特别是小于7nM,特别是小于6nM或特别是小于5nM;和/或

[0328] b. 例如如实施例8所述使用利用大体积反应的体外测定所测定的阻断ILT2与在JEG3细胞表面天然表达的HLA-G的结合的 IC_{50} 小于20pM;和/或

[0329] c. 例如如实施例8所述测定的阻断ILT4与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于1400pM。

[0330] 为了确定抗体是否与参照抗体竞争结合,在两种不同的实验设置中进行上述结合方法。在第一种设置中,使参考抗体在饱和条件下与抗原结合,随后评估测试抗体与抗原的结合。在第二种设置中,使测试抗体在饱和条件下与抗原结合,随后评估参考抗体与蛋白质/肽的结合。如果在两种实验设置中,只有第一(饱和)抗体能够结合蛋白质/肽,那么可以得出结论:测试抗体和参考抗体竞争结合抗原。如本领域技术人员将会理解的,与参考抗体竞争结合的抗体不一定与参考抗体结合相同的表位,但可能通过结合重叠或相邻的表位而在空间上阻断参考抗体的结合,或者导致构象变化,从而导致缺乏结合。

[0331] 如果每种抗体竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则这两种抗体与相同或重叠的表位结合。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变都减少或消除另一种抗体的结合,则这两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除了另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0332] 然后可以进行额外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗体结合的缺乏是否实际上是由于与参考抗体结合抗原的相同部分所致,或者空间阻断

(或另一种现象)是否是所观察到的结合缺乏的原因。这类实验可使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域可用的任何其它定量或定性抗体结合测定来进行。

[0333] 抗体变体

[0334] 本领域技术人员还将理解,抗体可以经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度通常取决于用于表达抗体的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可包括糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺的变化。一种常见的修饰是由于羧肽酶的作用而丢失羧基末端的碱性残基(诸如赖氨酸或精氨酸)(如Harris,RJ. Journal of Chromatography 705:129-134,1995中所述)。因此,抗体重链的C末端赖氨酸可能缺失。

[0335] 在一个实施方案中,来自抗体的C末端氨基酸在翻译后修饰过程中被切割。

[0336] 在一个实施方案中,来自抗体的N末端氨基酸在翻译后修饰过程中被切割。

[0337] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失的抗体变体。用于取代诱变(substitutional mutagenesis)的目标部位包括CDR和FR。可将氨基酸取代引入目标抗体中,并针对期望的活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC、CDC和/或ADCP)筛选产物。

[0338] 在某些实施方案中,设想了本文所述抗体的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其它生物特性。抗HLA-G抗体的氨基酸序列变体可通过在编码蛋白质的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如从抗HLA-G抗体的氨基酸序列内(诸如在一个或多个CDR和/或框架序列中或在VH和/或VL结构域中)删除和/或插入和/或取代残基。可以进行缺失、插入和取代的任何组合来获得最终构建体,只要最终构建体具有所需的特征。

[0339] 在本文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或者未改变,或者包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0340] 应当理解,可对本发明提供的CDR进行一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失,而不会显著改变抗体结合HLA-G和中和HLA-G活性的能力。任何氨基酸取代、添加和/或缺失的效果可由本领域技术人员容易地测试,例如通过使用本文描述的方法(特别是实施例中说的那些方法)来确定HLA-G结合和对HLA-G与其天然配体的相互作用的抑制。

[0341] 因此,在变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个CDR包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代,其中此类氨基酸取代是保守的,并且其中抗体保留其与HLA-G的结合特性。

[0342] 因此,本发明提供了抗HLA-G抗体,其包含选自CDR-L1(含有SEQ ID NO:1)、CDR-L2(含有SEQ ID NO:2)、CDR-L3(含有SEQ ID NO:3)、CDR-H1(含有SEQ ID NO:4)、CDR-H2(含有SEQ ID NO:5)和CDR-H3(含有SEQ ID NO:6)的一个或多个CDR,其中一个或多个所述CDR中的一个或多个氨基酸被另一种氨基酸(例如,下文定义的类似氨基酸)取代。

[0343] 在一个实施方案中,本发明提供了抗HLA-G抗体,其包含CDR-L1(含有SEQ ID NO:1)、CDR-L2(含有SEQ ID NO:2)、CDR-L3(含有SEQ ID NO:3)、CDR-H1(含有SEQ ID NO:4)、CDR-H2(含有SEQ ID NO:5)和CDR-H3(含有SEQ ID NO:6),例如其中一个或多个所述CDR中的一个或多个氨基酸被另一种氨基酸(诸如,下文定义的类似氨基酸)取代。

[0344] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含含有三个CDR的轻链可变区,其中CDR-L1的序列包含与SEQ ID NO:1中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,和/或CDR-L2包含与SEQ

ID NO:2中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列和/或CDR-L3包含与SEQ ID NO:3中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0345] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含含有三个CDR的重链可变区,其中CDR-H1的序列包含与SEQ ID NO:4中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,和/或CDR-H2包含与SEQ ID NO:5中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列和/或CDR-H3包含与SEQ ID NO:6中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0346] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:23中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0347] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:93、27、33、57、69、75、81或87中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0348] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含与SEQ ID NO:19中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,和/或重链可变区包含与SEQ ID NO:93中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0349] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含分别含有SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列,并且轻链和重链可变区的其余部分分别与SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:93具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性或相似性。

[0350] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:25中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0351] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0352] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是包含轻链和重链的IgG1,所述轻链包含与SEQ ID NO:21中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,所述重链包含与SEQ ID NO:95中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0353] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是IgG1,其包含分别在SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中给出的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3,并且轻链和重链的其

余部分分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:95具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或相似性。

[0354] 本发明在本文中提供的抗HLA-G抗体变体保留了亲本抗体(即未经修饰的抗体)的有利特性,即上述功能特性,例如高特异性、高亲和力、ILT2和/或ILT4阻断活性。在一个实例中,本发明提供的抗HLA-G抗体变体:

[0355] a. 如例如通过SPR在25°C的温度下测定的,作为全长抗体表达的所述抗体与HLA-G的单体形式之间的解离常数(K_D)小于20nM,特别是小于15nM,特别是小于10nM,特别是小于9nM,特别是小于8nM,特别是小于7nM,特别是小于6nM或特别是小于5nM;和/或

[0356] b. 如例如如实施例8所述使用利用大体积反应的体外测定所测定的,阻断ILT2与在JEG3细胞表面天然表达的HLA-G的结合的 IC_{50} 小于20pM;和/或

[0357] c. 如例如如实施例8所述测定的,阻断ILT4与HLA-G的结合的 IC_{50} 小于1400pM。

[0358] 序列同一性和相似性

[0359] 可以很容易地计算序列之间的同一性和相似性的程度。“序列同一性%”(或“序列相似性%”)的计算方法如下:(1)在比较窗口(例如,较长序列的长度、较短序列的长度、指定的窗口等)内比较两个最佳比对的序列,(2)确定含有相同(或相似)氨基酸的位置(例如,相同的氨基酸出现在两个序列中,相似的氨基酸出现在两个序列中)的数量以产生匹配位置的数量,(3)将匹配位置的数量除以比较窗口(例如,较长序列的长度、较短序列的长度、指定的窗口)中位置的总数,以及(4)将结果乘以100以获得序列同一性%或序列相似性%。

[0360] 用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482(1981)的局部同源算法,通过Needleman& Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)的同源比对算法,通过Pearson&Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988)的相似性搜索算法,通过这些算法的计算机化实现(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.),或通过手动比对和目视检查(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人,编辑1995年增刊)来进行。

[0361] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的优选实例包括BLAST和BLAST 2.0算法,所述算法描述于Altschul等人,Nuc. Acids Res. 25:3389-3402(1977)和Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)中。多肽序列也可使用FASTA,利用默认或推荐的参数进行比较。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询序列与搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性。

[0362] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个CDR内,只要此类改变不会显著降低抗体结合靶标的能力即可。

[0363] 例如,可在CDR中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变。此类改变可在CDR中抗原接触残基之外进行。

[0364] 表1显示了保守取代以及更实质性的“示例性取代”。

[0365] 表1:氨基酸取代的实例

[0366]

原始残基	示例性取代	保守取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;	Leu

[0367] 抗体变体的生物学特性的实质性修饰可通过选择取代来实现,所述取代在它们对维持多肽主链在取代区域中的结构、分子在靶位点上的电荷或疏水性、或侧链体积的影响方面显著不同。氨基酸可根据其侧链性质的相似性进行分类(于A.L.Lehninger, Biochemistry第2版,第73-75页,Worth Publishers,New York(1975)中)。

[0368] 一种类型的取代变体涉及替代亲代抗体(人源化或人抗体)的一个或多个CDR区残基。通常,选择用于进一步研究的一种或多种所得变体相对于亲本抗体将具有某些生物特性的变化(例如,增强的亲和力、降低的免疫原性)和/或将基本上保留了亲本抗体的某些生物特性。示例性的取代变体是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术来方便地产生。简言之,使一个或多个CDR残基突变,并将变体抗体展示在噬菌体上并筛选其特定的生物活性(例如结合亲和力)。

[0369] 可在CDR中进行改变(例如,取代),例如以提高抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中进行高频突变的密码子编码的残基)(参见,例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或与抗原接触的残基中进行,测试所得变体VH或VL的结合亲和力。例如,在Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人,编辑,Human Press,Totowa,NJ,(2001)中描述了通过构建二级文库并从其中重新选择来实现亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。

[0370] 可用于鉴定可作为诱变靶标的抗体的残基或区域的方法之一是丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085)。在该方法中,鉴定一个残基或多个靶残基并用丙氨酸替换,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可选地或另外地,抗

原-抗体复合物的X射线结构可用于鉴定抗体与其抗原之间的接触点。可筛选变体以确定它们是否包含所需的特性。

[0371] 恒定区变体

[0372] 在一些实施方案中,可将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区中,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0373] 描述了与FcR结合增强或减弱的某些抗体变体。(参见,例如,US 6,737,056;WO 2004/056312和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0374] 例如在US2005/0014934A1中描述了半衰期延长且与新生儿Fc受体(FcRn)结合得到改善的抗体。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改善了Fc区与FcRn的结合。

[0375] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代(例如Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的取代)的Fc区。

[0376] 效应子功能降低的抗体包括Fc区残基234、235、237、238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个被取代的抗体(参见,例如,US.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处发生取代的Fc突变体,其中氨基酸残基根据EU编号系统进行编号。

[0377] 可以进行体外和/或体内细胞毒性测定来证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达FcRI、Fc γ RII和Fc γ RIII。FcR在造血细胞上的表达概括于Ravetch和Kinetic,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)中。US5,500,362;US5,821,337中描述了评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例。可选地或另外地,可在体内例如在诸如Clynes等人Proc.Nat l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中评估目标分子的ADCC活性。也可进行C1q结合测定来证实抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可进行CDC测定(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.I Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可使用本领域已知的方法进行(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0378] 本发明的抗体分子的恒定区结构域(如果存在的话)可以根据抗体分子的预期功能,特别是可能需要的效应子功能来进行选择。例如,恒定区结构域可以是人IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地,当抗体分子旨在用于治疗性用途并且需要抗体效应子功能时,可使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型的恒定区结构域。或者,当抗体分子旨在用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型。应当理解,也可以使用这些恒定区结构域的序列变体。

[0379] 在一些实施方案中,本发明的抗体是野生型人IgG1(称为IgG1)。

[0380] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG1 LALA,一种其中在IgG1的恒定区引入了氨基酸取代L234A/L235A(根据EU编号)的野生型人IgG1同种型的突变体。在一个实施方案

中,本发明的抗体包含含有序列SEQ ID NO:21的轻链和含有序列SEQ ID NO:97的重链。

[0381] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG1 LALAGA,一种其中在IgG1的恒定区中引入了氨基酸取代L234A/L235A/G237A(根据EU编号)的野生型人IgG1同种型的突变体。

[0382] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG4P,一种其中氨基酸228(根据EU编号)被脯氨酸取代(如例如Angal等人,Molecular Immunology,1993,30(1),105-108中所述的)的野生型人IgG4同种型的突变体。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有序列SEQ ID NO:21的轻链和含有序列SEQ ID NO:99的重链。

[0383] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG4 FALA,一种其中在IgG4的恒定区引入了取代F234A/L235A(根据EU编号)的野生型人IgG4同种型的突变体。

[0384] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG4P FALA,一种其中氨基酸228(根据EU编号)被脯氨酸取代并且在IgG4恒定区中引入了酸取代F234A/L235A(根据EU编号)的野生型人IgG4同种型的突变体。在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有序列SEQ ID NO:21的轻链和含有序列SEQ ID NO:101的重链。

[0385] 糖基化变体

[0386] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低抗体被糖基化的程度。向抗体中添加或删除糖基化位点可通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基化位点来方便地完成。

[0387] 在一个实施方案中,本发明的抗体是糖修饰的。在一个实施方案中,本发明的抗体具有低或无岩藻糖含量。“岩藻糖含量”是指连接到每种抗体的每条重链的Fc片段的Asn297残基上的N-聚糖中岩藻糖基化形式的百分比。“低岩藻糖含量”是指小于或等于65%的岩藻糖含量。事实上,目前已知抗体组合物的低岩藻糖含量在所述组合物通过Fc γ RIII诱导强ADCC反应的能力中起着至关重要的作用。有利的是,岩藻糖含量小于或等于65%,优选小于或等于60%、55%或50%,甚至小于或等于45%、40%、35%、30%、25%或20%。然而,岩藻糖含量不一定为零,例如其可以小于或等于5%、10%、15%或20%。

[0388] 在一个实施方案中,本发明的抗体是无岩藻糖基化的IgG1。产生无岩藻糖基化的IgG1的方法是公知的,包括产生经遗传修饰用于产生无岩藻糖基化的抗体的细胞。在一个实施方案中,在CHO细胞中产生本发明的无岩藻糖基化的IgG1,其中其中编码 α 1,6岩藻糖基转移酶(FUT8)的基因通过本领域公知的方法遗传敲除。例如,可如本文提供的实施例中所使用KO FUT8 CHOSXE/DG44细胞。

[0389] 在一个实施方案中,本发明的抗体具有改善的ADCC和/或ADCP和/或具有改善的耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力。在一个实施方案中,与相应的常规(即岩藻糖基化的)抗体(即包含相同氨基酸序列但包含岩藻糖的抗体,例如在未经修饰且表达FUT8的CHO细胞中产生的抗体)相比,根据本发明的无岩藻糖基化的抗体的ADCC和/或ADCP功能和/或耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力得到改善。在本发明的说明书中,“改善的”活性(例如ADCC和/或ADCP和/或肿瘤细胞耗竭)是指无岩藻糖基化的抗体的活性(例如ADCC和/或ADCP和/或肿瘤细胞耗竭)比参考抗体(即相应的常规(即岩藻糖基化的)抗体)的相同活性高至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0390] 可以进行本领域公知的体外和/或体内细胞毒性测定来证实ADCC和/或ADCP活性的增强,例如如本文所述的。

[0391] 在一个实施方案中,本发明的抗体是无岩藻糖基化的IgG1,其包含:

[0392] a.含有SEQ ID NO:21或17或25的轻链;和/或

[0393] b.含有SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89的重链。

[0394] 在一个实施方案中,本发明的抗体是无岩藻糖基化的IgG1,其包含:

[0395] a.与SEQ ID NO:21或17或25具有至少90%同一性或相似性的轻链;和/或

[0396] b.与SEQ ID NO:95、29、35、59、71、77、83或89具有至少90%同一性或相似性的重链。

[0397] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是包含轻链和重链的无岩藻糖基化的IgG1,所述轻链包含与SEQ ID NO:21中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,所述重链包含与SEQ ID NO:95中给出的序列具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0398] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是无岩藻糖基化的IgG1,其包含分别在SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中给出的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3,并且轻链和重链的其余部分分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:95具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性或相似性。

[0399] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是无岩藻糖基化的IgG1,其包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19并且所述重链可变区包含SEQ ID NO:93,并且其中轻链和重链的其余部分分别与SEQ ID NOs:21和95具有至少90%的同一性或相似性。

[0400] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链,并且具有改善的ADCC和/或ADCP功能,和/或具有改善的耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力。在一个实施方案中,与相应的常规抗体(即与包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链的无岩藻糖基化的抗体)相比,ADCC和/或ADCP功能和/或耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力得到改善。

[0401] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链,并且具有改善的CDC功能,和/或具有改善的耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力。在一个实施方案中,与相应的常规抗体(即与包含含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链的无岩藻糖基化的抗体)相比,CDC功能和/或耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力得到改善。

[0402] 在一个实施方案中,本发明的抗HLA-G抗体是无岩藻糖基化的IgG1,其包含含有SEQ ID NO:19的轻链可变区和含有SEQ ID NO:93的重链可变区,或含有SEQ ID NO:21的轻链和含有SEQ ID NO:95的重链,并且具有改善的ADCC和/或ADCP和/或CDC功能,以及具有改善的耗竭表达HLA-G的肿瘤细胞的能力。

[0403] 生物分子(诸如抗体)含有酸性和/或碱性官能团,从而为分子赋予净正电荷或负电荷。“观察到的”总电荷量将取决于实体的绝对氨基酸序列、3D结构中带电基团的局部环境以及分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或其溶剂可及表面不带净电荷时的pH值。在一个实例中,结合HLA-G的抗体可被工程改造成具有合适的等电点。这可产生具有更强劲的特性(特别是合适的溶解性和/或稳定性特征和/或改善的纯化特性)的抗体。

[0404] 例如,可以通过替换氨基酸残基,例如用一个或多个碱性氨基酸残基替换酸性氨基酸残基来工程改造抗体。或者,可以引入碱性氨基酸残基或去除酸性氨基酸残基。或者,如果分子具有不可接受的高pI值,可以根据需要引入酸性残基来降低pI。重要的是,当操作pI时,必须小心以保持抗体或片段的所需活性。因此,在一个实施方案中,经工程改造的抗体具有与“未经修饰的”抗体或片段相同或基本相同的活性。

[0405] 诸如**ExPASy等程序(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, and http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html)可用于预测抗体的等电点。

[0406] 效应分子

[0407] 如果需要,可将用于本发明的抗体缀合于一种或多种效应分子。

[0408] 应当理解,效应分子可包含单个效应分子或两个或更多个此类分子,它们连接在一起以形成可以连接到本发明抗体上的单个部分。当需要获得与效应分子连接的抗体片段时,这可通过标准的化学或重组DNA方法制备,其中将抗体片段直接或通过偶联剂与效应分子连接。将此类效应分子与抗体缀合的技术是本领域公知的(参见,Hellstrom等人, *Controlled Drug Delivery*, 第2版, Robinson等人, 编辑, 1987, 第623-53页; Thorpe等人, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58和Dubowchik等人, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123)。具体的化学程序包括例如WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476和WO 03031581中描述的那些。或者,当效应分子是蛋白质或多肽时,可使用重组DNA程序实现键联,例如如WO 86/01533和EP 0392745中所述的。

[0409] 本文使用的术语效应分子包括例如抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白(例如酶)、其它抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段(例如DNA、RNA及其片段)、放射性核素(尤其是放射性碘)、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报告基团(诸如荧光化合物或可通过NMR或ESR光谱检测的化合物)。

[0410] 效应分子的实例可包括细胞毒素或细胞毒剂,包括任何对细胞有害(例如杀死)的剂。实例包括考布他汀类(combrestatins)、多拉司汀类、埃坡霉素、星形孢菌素类、美登素类、海绵抑素类、力索新(rhizoxin)、软海绵素类、杆孢菌素类(roridins)、哈密特林类(hemiasterlins)、紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽环二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0411] 效应分子还包括但不限于抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(例如氮芥、硫代苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如柔红霉素(原道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(原放线菌素)、博来霉素、光辉霉素、氨基霉素(AMC)、刺孢霉素或倍癌霉素)和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0412] 其它效应分子可以包括螯合的放射性核素诸如¹¹¹In和⁹⁰Y、Lu¹⁷⁷、铋²¹³、镅²⁵²、铀¹⁹²和钨¹⁸⁸/铼¹⁸⁸;或药物,诸如但不限于烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷类和苏拉明。

[0413] 其它效应分子包括蛋白质、肽和酶。目标酶包括但不限于蛋白水解酶、水解酶、裂解酶、异构酶、转移酶。目标蛋白质、多肽和肽包括但不限于免疫球蛋白、毒素诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素、蛋白质诸如胰岛素、肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原激活剂、血栓形成剂或抗血管生成剂例如血管抑素或内皮抑素，或生物反应调节剂诸如淋巴因子、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、神经生长因子 (NGF) 或其它生长因子和免疫球蛋白。

[0414] 其它效应分子可包括可用于例如诊断的可检测物质。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性核素、正电子发射金属 (用于正电子发射断层扫描) 和非放射性顺磁性金属离子。关于可与抗体缀合以用作诊断剂的金属离子，一般参见美国专利第4,741,900号。合适的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基包括链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白和生物素；合适的荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸酯荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白；合适的发光材料包括鲁米诺；合适的生物发光材料包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白；以及合适的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 ^{99}Tc 。

[0415] 在另一个实例中，效应分子可以在体内延长抗体的半衰期，和/或降低抗体的免疫原性和/或增强抗体穿过上皮屏障向免疫系统的递送。这种类型的合适的效应分子的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物诸如WO 05/117984中所述的那些。

[0416] 当效应分子是聚合物时，其通常可以是合成的或天然存在的聚合物，例如任选取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚链烯基 (polyalkenylene) 或聚氧化烯聚合物或者支链或非支链多糖，例如同多糖或杂多糖。

[0417] 可存在于上述合成聚合物上的具体的任选取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基。

[0418] 合成聚合物的具体实例包括任选取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)聚(乙烯醇)或其衍生物，尤其是任选取代的聚(乙二醇)，诸如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0419] 具体的天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。

[0420] 本文所用的“衍生物”旨在包括反应性衍生物，例如巯基选择性反应性基团，诸如马来酰亚胺等。反应性基团可以直接或通过接头区片段连接到聚合物上。应当理解，这种基团的残基在一些情况下将作为抗体片段与聚合物之间的连接基团形成产物的一部分。

[0421] 聚合物的大小可以根据需要变化，但通常平均分子量范围为500Da至50000Da，例如5000Da至40000Da，诸如2000Da至40000Da。尤其可以根据产品的预期用途，例如定位于某些组织诸如肿瘤或延长循环半衰期的能力来选择聚合物的大小 (关于综述，参见见Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545)。因此，例如，当产品旨在离开循环系统并渗透组织时，使用小分子量聚合物 (例如分子量约为5000Da) 的聚合物可能是有利的。对于产品保留在循环中的应用，使用较高分子量的聚合物 (例如具有在20000Da至40000Da的范围内的分子量) 可能是有利的。

[0422] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物，诸如聚(乙二醇)或尤其是甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物，尤其是分子量在约15000Da至约40000Da的范围内的所述聚合物。

[0423] 在一个实例中,将用于本发明的抗体附接于聚(乙二醇)(PEG)部分。在一个特定的实例中,抗体是抗体片段,并且可以通过位于抗体片段中的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任何游离氨基、亚氨基、巯基、羟基或羧基)附接PEG分子。此类氨基酸可以天然存在于抗体片段中,或者可以使用重组DNA方法工程改造到片段中(参见例如US 5,219,996;US 5,667,425;WO 98/25971)。在一个实例中,本发明的抗体分子是经修饰的Fab片段,其中该修饰是向其重链的C末端添加一个或多个氨基酸以允许效应分子的附接。合适地,额外的氨基酸形成含有一个或多个可将效应分子附接于其的半胱氨酸残基的经修饰的铰链区。多个位点可用于附接两个或更多个PEG分子。

[0424] 合适地,可以通过位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的巯基共价连接PEG分子。附接于经修饰的抗体片段的每个聚合物分子可以共价连接到位于片段中的半胱氨酸残基的硫原子上。共价键联通常是二硫键,或者特别是硫-碳键。当巯基用作适当活化的效应分子的附接点时,例如可使用巯基选择性衍生物诸如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。如上所述,活化的聚合物可用作制备聚合物修饰的抗体片段的起始材料。活化的聚合物可以是任何含有巯基反应性基团的聚合物,诸如 α -卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺,酰亚胺,例如马来酰亚胺、乙烯基砷或二硫化物。此类起始材料可以商购获得(例如从Nektar, formerly Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA),或者可使用常规化学方法从商购可得的起始材料制备。特定的PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可从Nektar(原Shearwater); Rapp Polymere;和SunBio获得)和M-PEG-SPA(可从Nektar(原Shearwater)获得)。

[0425] 在一个实施方案中,抗体是例如根据EP 0948544或EP 1090037中公开的方法聚乙二醇化(即具有与其共价附接的PEG(聚(乙二醇))的经修饰的Fab片段或diFab[另见“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J. Milton Harris(编辑), Plenum Press, New York, “Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”, 1997, J. Milton Harris和S. Zalipsky(编辑), American Chemical Society, Washington DC和“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. Aslam和A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一个实例中,将PEG附接于铰链区中的半胱氨酸。在一个实例中,PEG修饰的Fab片段在经修饰的铰链区中具有与单个巯基共价连接的马来酰亚胺基团。赖氨酸残基可以共价连接到马来酰亚胺基团上,并且赖氨酸残基上的每个胺基可以附接分子量约为20,000Da的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此,附接至Fab片段的PEG的总分子量可以约为40,000Da。

[0426] 在一个实施方案中,抗体是在其重链的C-末端处具有经修饰的铰链区的经修饰的Fab'片段,所述铰链区含有至少一个附接有效应分子的半胱氨酸残基。合适的效应分子是PEG,并使用WO 98/25971和WO 2004072116或WO 2007/003898中描述的方法进行附接。可以使用国际专利申请WO 2005/003169、WO 2005/003170和WO2005/003171中描述的方法将效应分子附接于抗体片段。

[0427] 在一个实施方案中,抗体不附接效应分子。

[0428] 多核苷酸和载体

[0429] 本发明还提供了编码根据本发明的抗体或其部分的分离的多核苷酸(诸如表2中列出的氨基酸SEQ ID)。在整个本说明书中,术语“分离的”意指多核苷酸存在于与其在自然

界中可能存在的物理环境不同的物理环境中。

[0430] 根据本发明的分离的多核苷酸可包括合成DNA (例如通过化学处理产生的)、cDNA、基因组DNA或其任意组合。

[0431] 表2:12389抗HLA-G抗体的氨基酸序列及其相应的核酸序列。

	抗体序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
		12389gL2gH16 VL	19
	12389gL2gH16l 轻链	21	22
[0432]	12389gL2gH16 VH	93	94
	12389gL2gH16 重链 IgG1	95	96
	12389gL2gH16 重链 IgG1 LALA	97	98
	12389gL2gH16 重链 IgG4P	99	100
	12389gL2gH16 重链 IgG4P FALA	101	102

[0433] 本文提供了合适序列的实例。因此,在一个实施方案中,本发明提供了编码抗体的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID No 16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102中给出的序列。

[0434] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明抗体的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码轻链可变区,其中该多核苷酸:

[0435] i. 与SEQ ID NO:20、16或24至少90%相同;或者

[0436] ii. 包含SEQ ID NO:20、16或24或由其组成。

[0437] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明抗体的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码重链可变区,其中所述多核苷酸:

[0438] i. 与SEQ ID NO:94、28、34、58、70、76、82或88至少90%相同;或者

[0439] ii. 包含SEQ ID NO:94、28、34、58、70、76、82或88或由其组成。

[0440] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明抗体的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码轻链,其中所述多核苷酸:

[0441] i. 与SEQ ID NO:22、18或26至少90%相同;或者

[0442] ii. 包含SEQ ID NO:22、18或26或由其组成。

[0443] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明抗体的分离的多核苷酸,其中多核苷酸编码重链,其中多核苷酸:

[0444] i. 与SEQ ID NO:96、30、36、60、72、78、84或90至少90%相同;或者

[0445] ii. 包含SEQ ID NO:96、30、36、60、72、78、84或90或由其组成。

[0446] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本发明的IgG1抗体的重链的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:96、30、36、60、72、78、84或90中给出的序列或由其组成。

[0447] 还提供了编码本发明的IgG1抗体轻链的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:22、

18或26中给出的序列或由其组成。

[0448] 在优选实施方案中,本发明提供了编码本发明的IgG1抗体的重链和轻链的分离的多核苷酸,其中编码重链的多核苷酸包含SEQ ID NO:96中给出的序列,编码轻链的多核苷酸包含SEQ ID NO:22中给出的序列。

[0449] 本发明还提供了包含一种或多种本文所述多核苷酸的克隆性载体或表达载体。在一个实例中,根据本发明的克隆性载体或表达载体包含一种或多种如上所述的分离的多核苷酸。

[0450] 分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明的抗体的DNA序列。可使用寡核苷酸合成技术完全或部分合成所需的DNA序列。适当时可以使用定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术。

[0451] 可籍以构建载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员熟知的。在这方面,参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999,F.M.Ausubel(编辑),Wiley Interscience,New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing。

[0452] 用于产生抗体的宿主细胞

[0453] 还提供了包含一种或多种根据本发明的分离的多核苷酸序列的宿主细胞,或包含一种或多种编码本发明的抗体的分离的多核苷酸序列的一种或多种克隆性载体或表达载体。任何合适的宿主细胞/载体系统都可用于表达编码本发明的抗体的多核苷酸序列。可使用细菌(例如大肠杆菌(E.coli))和其它微生物系统,也可以使用真核(例如哺乳动物)宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0454] 在另外一个实施方案中,提供了包含这样的一种或多种核酸或一种或多种载体的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,已用其转化):(1)包含编码包含抗HLA-G抗体的VL的氨基酸序列和包含抗HLA-G抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码包含抗HLA-G抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗HLA-G抗体和VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞,例如大肠杆菌细胞。在一个实施方案中,提供了制备抗HLA-G抗体的方法,其中所述方法包括在适合抗体表达的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞(如上文提供的),以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体。

[0455] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如,U.S.5,648,237、5,789,199和5,840,523。(另见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述抗体片段在细菌的表达)。表达后,可将抗体以可溶性级分从细菌细胞糊中分离,并且可将其进一步纯化。

[0456] 除了原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是用于抗体编码载体的合适克隆性或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”,从而产生具有部分或全部人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004)和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0457] 用于本发明的合适类型的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞可包括 CHO 和 CHO-K1 细胞 (包括 dhfr-CHO 细胞, 诸如 CHO-DG44 细胞和 CHO-DXB11 细胞, 并且其可与 DHFR 选择标记一起使用), 或 CHOK1-SV 细胞, 其可与谷氨酰胺合成酶选择标记一起使用。用于表达抗体的其它细胞类型包括淋巴细胞细胞系, 例如 NS0 骨髓瘤细胞和 SP2 细胞、COS 细胞。宿主细胞可用根据本发明的分离的多核苷酸序列或表达载体稳定转化或转染。

[0458] 在一个实施方案中, 在宿主细胞中产生本发明的抗体, 所述宿主细胞已被遗传修饰成降低或消除 $\alpha 1, 6$ 岩藻糖基转移酶 (FUT8) 的功能。在一个实施方案中, 经遗传修饰的细胞是 CHO 细胞, 且 FUT8 基因已被敲除 (KO FUT8)。在一个实施方案中, 用于生产本发明抗体的宿主细胞是 CHO-DG44。在一个实施方案中, 用于生产本发明的抗体的宿主细胞是 KO FUT8 CHOSXE/DG44 细胞, 其可以根据本文提供的实施例中描述的方法产生。

[0459] 抗体的生产方法

[0460] 本发明还提供了生产根据本发明的抗体的方法, 包括在适合生产根据本发明的抗体的条件下培养根据本发明的宿主细胞以及分离抗体。

[0461] 本发明还提供了用于生产包含根据本发明的抗体的药物组合物的方法, 其包括在适合生产根据本发明的抗体的条件下培养根据本发明的宿主细胞, 分离抗体, 以及将抗体配制成药物组合物。

[0462] 抗体可以只包含重链或轻链多肽, 在这种情况下, 只需使用重链或轻链多肽编码序列来转染宿主细胞。为了生产包含重链和轻链的抗体, 可用两种载体转染细胞系, 第一载体编码轻链多肽, 第二载体编码重链多肽。或者, 可使用单一载体, 所述载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0463] 因此, 提供了培养宿主细胞并表达抗体、分离抗体并任选地纯化抗体以提供分离的抗体的方法。在一个实施方案中, 所述方法还包括将效应分子缀合于分离的抗体的步骤。

[0464] 本发明还提供了根据本发明产生抗体的方法, 其包括在适于导致从编码本发明的抗体分子的 DNA 中表达蛋白质的条件下培养含有本发明的载体的宿主细胞, 以及分离抗体分子。

[0465] 根据本发明的抗体以良好的水平从宿主细胞表达。因此, 抗体的特性似乎是为商业加工而优化的。

[0466] 在一个实施方案中, 提供了呈基本上纯化的形式 (特别是不含或基本上不含内毒素和/或宿主细胞蛋白质或 DNA) 的纯化的抗体, 例如人源化抗体, 特别是根据本发明的抗体。

[0467] 基本上不含内毒素通常旨在指内毒素含量为 1EU/mg 抗体产物或更少, 诸如 0.5 或 0.1EU/mg 产物。

[0468] 基本上不含宿主细胞蛋白质或 DNA 通常旨在指宿主细胞蛋白质和/或 DNA 含量为 400 μ g/mg 抗体产物或更少, 诸如 100 μ g/mg 或更少, 特别是 20 μ g/mg, 视情况而定。

[0469] 药物组合物、剂量和给药方案

[0470] 可在药物组合物或诊断组合物中提供本发明的抗体。因此, 本发明还提供了药物或诊断组合物, 其包含本发明的抗体以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0471] 优选地, 所述药物或诊断组合物包含特异性结合 HLA-G 的抗体, 其中抗体包含:

[0472] a.轻链可变区,其包含:

[0473] i.含有SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0474] ii.含有SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0475] iii.含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及

[0476] b.重链可变区,其包含:

[0477] i.含有SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0478] ii.含有SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0479] iii.含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0480] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体是唯一的活性成分。在另一个实施方案中,将根据本发明的抗体与一种或多种另外的活性成分组合。在一个实施方案中,将根据本发明的抗体与针对CD47的抗体组合。因此,在一个实施方案中,提供了特异性结合HLA-G的抗体,其中所述抗体包含:

[0481] a.轻链可变区,其包含:

[0482] i.含有SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0483] ii.含有SEQ ID NO:2的CDR-L2和

[0484] iii.含有SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及

[0485] b.重链可变区,其包含:

[0486] i.含有SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0487] ii.含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和

[0488] iii.含有SEQ ID NO:6的CDR-H3,

[0489] 并且其中所述抗体与结合CD47的第二抗体组合。

[0490] 或者,所述药物组合物包含根据本发明的抗体作为唯一活性成分,并且其可以与其它治疗剂、诊断剂或缓和剂组合(例如同时、依次或分别)单独施用给患者。

[0491] 可以适当地向患者施用根据本发明的药物组合物以确定所需的治疗有效量。本文所用术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防目标疾病或疾患,或表现出可检测的治疗或预防效果所需的治疗剂的量。对于任何抗体,治疗有效量最初可在细胞培养测定中或在动物模型中(通常在啮齿类动物、兔子、狗、猪或灵长类动物中)进行估计。动物模型也可用于确定施用的合适浓度范围和途径。然后,这些信息可用于确定用于人体施用的有用剂量和途径。

[0492] 人受试者的精确治疗有效量将取决于疾病状态的严重程度、受试者的总体健康状况、受试者的年龄、体重和性别、饮食、施用时间和频率、一种或多种药物组合、反应敏感性和对治疗的耐受性/反应。通常,治疗有效量为0.01mg/kg至500mg/kg,例如0.1mg/kg至200mg/kg,诸如100mg/kg。药物组合物可以方便地以每剂量含有预定量的本发明的活性剂的单位剂量形式存在。

[0493] 治疗组合物中的药学上可接受的载体可以另外含有液体,诸如水、盐水、甘油和乙醇。另外,在此类组合物中可以存在辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质。

[0494] 合适的施用形式包括适合肠胃外施用的形式,例如通过注射或输注,例如通过快速浓注或连续输注,以静脉内、可吸入或皮下形式施用。当产品用于注射或输注时,其可采用在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且其可含有配制剂

(formulatory agent), 诸如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者, 根据本发明的抗体可呈无水形式, 用于在使用前用合适的无菌液体复原。也可制备适于注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。

[0495] 一旦配制好, 就可向受试者直接施用本发明的组合物。因此, 本文提供了根据本发明的抗体用于制造药物的用途。

[0496] 优选地, 根据本发明的药物组合物适于向人受试者施用。

[0497] 因此, 在另一方面, 本发明提供了用于治疗的特异性结合HLA-G的抗体或包含所述抗体的药物组合物, 其中所述抗体包含:

[0498] a. 轻链可变区, 其包含:

[0499] i. 含有SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0500] ii. 含有SEQ ID NO:2的CDR-L2; 和

[0501] iii. 含有SEQ ID NO:3的CDR-L3; 以及

[0502] b. 重链可变区, 其包含:

[0503] i. 含有SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0504] ii. 含有SEQ ID NO:5的CDR-H2和

[0505] iii. 含有SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0506] 治疗适应症

[0507] 如本文中所示, 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得期望的药理和/或生理效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言, 该效果可以是预防性的, 和/或就部分或完全治愈疾病和/或该疾病引起的副作用而言, 该效果可以是治疗性的。因此, 治疗涵盖对哺乳动物中(尤其是人中)疾病的任何治疗, 并且包括: (a) 预防可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者发生该疾病; (b) 抑制疾病, 即阻止其发展; 和(c) 缓解疾病, 即引起疾病消退。

[0508] “治疗有效量”是指当向哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时, 足以产生这种疾病治疗的HLA-G抗体的量。治疗有效量将根据抗HLA-G抗体、疾病及其严重程度以及要治疗的受试者的年龄、体重等而变化。

[0509] 可施用本发明的抗体、制剂或其药物组合物以用于预防性和/或治疗性治疗。在预防性应用中, 以足以预防或减轻疾患或其一种或多种症状的后续影响的量向有患本文所述病症或疾患的风险的受试者施用给抗体、制剂或组合物。在治疗性应用中, 以足以治愈、缓解或部分抑制疾患或其一种或多种症状的量向已经患有本文所述病症或疾患的受试者施用抗体。这种治疗性治疗可导致疾病症状的严重程度降低, 或无症状期的频率或持续时间增加。

[0510] 本发明提供了治疗有需要的受试者的本文所述的病症或疾患的方法, 所述方法包括向受试者施用根据本发明的抗体或药物组合物。以治疗有效量施用这种抗体。

[0511] 本发明还提供了用于疗法, 特别是用于治疗本文所述的病症或疾患的本发明的抗体或药物组合物。

[0512] 本发明还提供了本发明的抗体或药物组合物用于制造药物, 特别是用于治疗本文所述的病症或疾患的用途。

[0513] 本发明的抗体可用于治疗、预防或改善任何与HLA-G活性相关的疾患; 例如, 任何

全部或部分由通过HLA-G受体的信号传导引起的疾患。

[0514] HLA-G相关疾病或病症尤其包括癌症(或肿瘤)、感染和自身免疫疾病。

[0515] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗以HLA-G的过表达为特征的疾病的本发明抗体或药物组合物

[0516] 本发明的抗体对于治疗或预防癌症(包括以HLA-G的过表达为特征的癌症)可以是特别有用的。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗癌症的本发明的抗体或药物组合物。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗特征在于HLA-G的过表达的癌症的本发明的抗体或药物组合物

[0517] 本发明的说明书中的癌症包括例如肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、胃癌、肝细胞癌、肺癌、成神经细胞瘤和血液癌症。本发明的抗体可用于治疗或预防液体癌症诸如血液癌症。

[0518] 本发明的抗体对于治疗或预防实体瘤可以是特别有用的。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗实体瘤的本发明抗体或药物组合物。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗特征在于HLA-G的过表达的实体瘤的本发明的抗体或药物组合物。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌的本发明的抗体或药物组合物。在一个特定的实施方案中,实体瘤是肾透明细胞癌(RCC)。在另一个特定的实施方案中,实体瘤是结直肠癌(CRC)。

[0519] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明的抗体或药物组合物用于制备用于治疗实体瘤的药物的用途。在一个实施方案中,本发明提供了本发明的抗体或药物组合物用于制备用于治疗特征在于HLA-G的过表达的实体瘤的药物的用途。在一个实施方案中,本发明提供了本发明的抗体或药物组合物用于制备用于治疗以下疾病的药物的用途:肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌的药物。在一个特定的实施方案中,实体瘤是肾透明细胞癌(RCC)。在另一个特定的实施方案中,实体瘤是结直肠癌(CRC)。

[0520] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗患者r实体瘤的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的本发明的抗体或药物组合物。在一个实施方案中,本发明提供了治疗患者的特征在于HLA-G的过表达的实体瘤的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的本发明的抗体或药物组合物。

[0521] 在一个实施方案中,实体瘤选自肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌和肝细胞癌。在一个特定的实施方案中,实体瘤是肾透明细胞癌(RCC)。在另一个特定的实施方案中,实体瘤是结直肠癌(CRC)。

[0522] 本发明还提供了本发明的抗体作为诊断活性剂或在诊断测定(例如用于诊断疾病或其严重性)中的用途。

[0523] 在一个实施方案中,本发明提供了通过使用根据本发明的抗体或药物组合物来诊断实体瘤的方法。在一个实施方案中,本发明提供了通过使用根据本发明的抗体或药物组合物来诊断特征在于HLA-G的过表达的实体瘤的方法。

[0524] 在一个实施方案中,本发明提供了通过使用根据本发明的抗体或药物组合物来诊断以下疾病的方法:肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌。在一个特定的实施方案中,实体瘤是肾透明细胞癌(RCC)。在另一个特定的实施

方案中,实体瘤是结直肠癌(CRC)。

[0525] 优选地,可对生物样品进行诊断。“生物样品”涵盖从个体获得的多种样品类型,并且可用于诊断或监测测定。该定义涵盖脑脊液、血液(诸如血浆和血清)和其它生物来源的液体样品(诸如尿液和唾液)、固体组织样品(诸如活检样本或组织培养物或从中衍生的细胞)及其后代。该定义还包括在其获得后以任何方式(诸如通过用试剂处理、溶解或富集某些组分(诸如多核苷酸))处理过的样品。

[0526] 诊断测试可优选在不与人体或动物体接触的生物样品上进行。这种诊断测试也称为体外测试。体外诊断测试可能依赖于在从受试者获得的生物样品中检测HLA-G的体外方法。

[0527] 在一个实施方案中,本发明提供了通过使用根据本发明的抗体或药物组合物来诊断生物样品中的表达HLA-G的实体瘤的方法。在一个实施方案中,本发明提供了通过使用根据本发明的抗体或药物组合物来在生物样品中诊断以下疾病的方法:肾透明细胞癌(RCC)、结直肠癌(CRC)、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌或肝细胞癌。

实施例

[0528] 实施例1:用于筛选测定的HLA-G、HLA-I和ILT2、ILT4蛋白的产生

[0529] 1.1.HLA-G蛋白:序列

[0530] 包含HLA-G的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 结构域的HLA-G的最丰富同种型HLA-G1(膜结合型)或HLA-G5(可溶性型)的序列用于产生HLA-G构建体以筛选抗HLA-G抗体

[0531] HLA-G胞外结构域或ECD的序列是基于晶体结构分析确定的(通过晶体学测定的,以斜体标示的 $\alpha 1$ 结构域-加下划线的 $\alpha 2$ 结构域- $\alpha 3$ 结构域-最终残基KQ)。HLA-G特有的20个残基以粗体标示:

[0532] *GS****SH****SMRYFSAAVSRPGRGEP****RF****IA****M****GYVDDTQFVRF****DS****DSACPRMEPRA*
*PWVEQEGPEYWEE****ET****RNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQW*
MIGCDLGSDGRL*LRGYEQYAYDGKDYLA****L****NEDLRSWTAADTAAQIS*
KRKCEAANVAEQRR*AYLEGTCVEWLHRYLENGKEM****L****QRADPPKTH*
VTHHPVFDYEAT*LRCWALGFYPAEI****IL****TWQRDGEDQTQDVELVETRP*
 [0533] ***AGDGT****FQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQ* (SEQ ID NO: 108)

[0534] ■可溶性HLA-G(HLA-G ECD):

[0535] 所述蛋白用AVIteV10HisTag(信号肽用粗体标示,抗生物素蛋白亲和标签或用于生物素化的AVI标签用下划线标示,Tev蛋白酶位点用下划线和斜体标示,10His标签用斜体标示)表达:

[0536] ***MVVMAPRTLFLLLSGALTLETETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMG***
YVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDR
MNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYL
ALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLE
NGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGED
QTQDVELVETRPAGDGTGFKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLML
RWKQGLNDIFEAQKIEWHELEENLYFQSGGSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:
 109)

[0537] 用于筛选测定的纯化的最终蛋白质序列包含以下序列(包含AVIteV10His标签):

[0538] ***GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTK***
AHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISK
RKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRD
GEDQTQDVELVETRPAGDGTGFKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQGLNDIFEAQKIEWHELEENL
YFQSGGSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:110)

[0539] ■用于细胞膜结合表达的HLA-G DNA序列:atggtcgtcatggcggccaggactctgtttct
 gcttctgtccggcgccttgacctgaccgagacttgggcccgaagccactcgatgcggtacttctccgcgccctg
 tctagaccgggtcggggagaacccccggttcacgcatgggctacgtggatgacaccagttcgtgcggttcgaca
 gcgattcagcctgccctcgatggagccgagagcccccttgggtggaacaggaagggccggagtactgggaagagga
 aacacgcaacaccaaggcccacgctcaaaccgaccgatgaacttcgacagctgcggggatactataaccagtc
 gaggcgtcgagccatacccttcaatggatgattggctgtgacctgggttccgacgggagactgctgcggggctacg
 agcagtacgctatgacggaaaggactacctggccctcaacgaagatctccgctcctggaccgctgccgatactgc
 ggcccagatctccaagcgaatgcaagcggctaattgtcgccgaacagcgaagggcctacctggaaggcacttgc
 gtggagtggctgcaccgctacctggagaacggaaaggaatgctgcagagggcagacccccctaagaccatgtca
 cccaccatcccgtgttcgactacgaagccacctgagatgctgggcgctgggctttaccctgccgagatcatcct
 gacctggcaacgcgacggggaagatcagaccaagacgtggaacttgtggagactagaccagccggcgatgggact
 ttccagaaatgggcagccgtggtcgtgccgtcgggagaggaacaacgctacacctgtcacgtgcagcacgagggtc
 tgccagagccccctgatgctgcggtggaagcagagctccctccccaccattccgatcatgggaattgtggcgggact
 cgtggtgctcggcgtgtcgtgactggagccgagtgagcgtgtgctctggcgaagaagtccctcagac (SEQ ID
 NO:111)

[0540] 相应的膜结合蛋白包含以下序列(表达后切割的信号肽

MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWA,跨膜和胞质结构域以斜体标示):

[0541] **GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFSDSDSACPR
MEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYY
NQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLALN
EDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLH
RYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPA
EILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGEE
QRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA AVVT
GAAVA AVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 107)**

[0542] ■ “HLA-G null 1,2,3”

[0543] “HLA-G null 1,2,3”对应于HLA-G,其中在HLA-G α 1、 α 2和 α 3上特异性表达的氨基酸被在其它HLA-I上表达的共有氨基酸取代(突变的20个氨基酸,在以下序列中以粗体标示)

[0544] HLA-I共有氨基酸源自EBI的免疫多态性数据库(Immuno Polymorphism Database)中的序列信息。对HLA-I全长蛋白进行了分析,并并对整个HLA-I组中的每个结构域(α 1-3)生成了残基分布图,这使得能够鉴定HLA-G特异性残基(总共20个)。

[0545] 序列信息还用于生成每个HLA蛋白的等位基因共有序列,所述共有序列用在所有等位基因中发现的最常见残基取代了规范序列中的位置。

[0546] 为了获得HLA-G null 1,2,3序列,将HLA-G特异性残基改变为在另外的HLA分子中的特定20个位置上发现的共有残基。

[0547] 可溶性蛋白(HLA-G null 1,2,3 ECD)用AVIteV10HisTag表达(信号肽用粗体标示,AVI标签用下划线标示,Tev蛋白酶位点用下划线和斜体标示,10His标签用斜体标示):

[0548] **MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSTAVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQF
VRFSDAASPRMEPRAPWVEQEGPEYWERETR NAKANAQTDRVNLRTL
RGYYNQSEAGSHTLQWMYGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDL
RSWTAADTAAQISKRKCEAAREAEQLRAYLEGTCVEWLHRYLENGKETL
QRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
LVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQGL
NDIFEAQKIEWHELEENLYFQSGSGSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 112)**

[0549] 表达后肽信号被切割,用于筛选测定的纯化的最终蛋白质序列包含以下序列:

[0550] **GSHSMRYFSTAVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASPRMEPRAPWVEQEGPEYWERETR NAK
ANAQTDRVNLRTL RGYYNQSEAGSHTLQWMYGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISK
RKCEAAREAEQLRAYLEGTCVEWLHRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQGLNDIFEAQKEWHELEENLY
FQSGSGSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:113)**

[0551] 用于细胞膜结合表达的“HLA-G null 1,2,3”DNA序列:atggtcgcatggcgcccagga
ctctgtttctgcttctgtccggcgcttgaccttgaccgagacttgggcccgaagccactcgatgcggtacttctc

caccgccgtgtctagaccgggtcggggagaaccccggttcacgcgcgtgggctacgtggatgacaccagttcgtg
 cggttcgacagcgatgccgctcacctcgcatggagccgagagcccccttgggtggaacaggaagggccggagtact
 gggaacgcgaaacacgcaacgccaaggccaacgctcaaaccgaccgggtcaacttgagaacgctgcggggatacta
 taaccagtcgagggcgggaagccatacccttcaatggatgtacggctgtgacctgggttccgacgggagactgctg
 cggggctacgagcagtagcctatgacggaaaggactacctggccctcaacgaagatctccgctcctggaccgctg
 ccgatactgcggcccagatctccaagcgaaatgcgaagcggctagagaagccgaacagctgagggcctacctgga
 aggcaacttgctggagtggctgcaccgctacctggagaacggaaaggaaacgctgcagagggcagacccccctaag
 acccatgtcactcaccacccgggtgtccgatcacgaggccaccctgaggtgctgggcactgggattctaccggcgg
 agatcacctgacctggcaacgggacggcgaagatcagaccaagacaccgagctcgtggaaaccaggcctgcggg
 tgatggaaccttcagaagtgggctgccgtgggtggctccatccggggaggagcaacggtacacttgtcacgtgcag
 cagagggactgcctgaaccctgactctgcgggtggaagcagagctccctccccaccattccgatcatgggaattg
 tggcgggactcgtggtgctcgccgctgtcgtgactggagccgagtgccagctgtgctctggcggagaagtcctc
 agac (SEQ ID NO:114)

[0552] 相应的膜结合蛋白包含以下序列(表达后切割的信号肽 ***MAPRTLFLLSGALTLTETWA***,跨膜和胞质结构域用斜体标示):

GSHSMRYFSTAVSRPGRGEPRIAIVGYVDDTQFVRFSDAASPRMEPRAP
 WVEQEGPEYWERETRNAKANAQTDRVNLRTLRYYNQSEAGSHTLQWM
 YGCDLGSDGRLLRGYEQAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKC

[0553] **EAAREAEQLRAYLEGTCVEWLHRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSD**
HEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFOKWA
AVVVPSEEGRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAADV
TGAAVAAVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 115)

[0554] ■ “HLA-G null 1,3”

[0555] “HLA-G null 1,3”对应于HLA-G,其中在HLA-G α 1和 α 3上特异性表达的氨基酸被在其它HLA-I上表达的共有氨基酸取代(在以下序列SEQ ID NO:117中突变的氨基酸用粗体标示)。

[0556] 蛋白质在细胞表面表达。用于细胞膜结合表达的DNA序列包含:atggtcgtcatggcg
 cccaggactctgtttctgcttctgtccggcgcccttgaccttgaccgagacttgggccggaagccactcgatgcggt
 acttctccaccgccgtgtctagaccgggtcggggagaaccccggttcacgcgcgtgggctacgtggatgacacca
 gttcgtgcggttcgacagcgatgccgctcacctcgcatggagccgagagcccccttgggtggaacaggaagggccg
 gactactgggaacgcgaaacacgcaacgccaaggccaacgctcaaaccgaccgggtcaacttgagaacgctgcggg
 gatactataaccagtcgagggctcgagccatacccttcaatggatgattggctgtgacctgggttccgacgggag
 actgctgcggggctacgagcagtagcctatgacggaaaggactacctggccctcaacgaagatctccgctcctgg
 accgctgccgatactgcggcccagatctccaagcgaaatgcgaagcggctaatgtcggcgaacagcgaagggcct
 acctggaaggcacttgcgtggagtggctgcaccgctacctggagaacggaaaggaaatgctgcagagggcagacc
 ccctaagaccatgtcactcaccacccgggtgtccgatcacgaggccaccctgaggtgctgggcactgggattctac
 ccggcggagatcacctgacctggcaacgggacggcgaagatcagaccaagacaccgagctcgtggaaccaggc
 ctgcgggtgatggaaccttcagaagtgggctgccgtgggtggctccatccggggaggagcaacggtacacttgtca

cgtgcagcacgagggactgcctgaacccctgactctgcggtggaagcagagctccctccccaccattccgatcatg
ggaattgtggcgggactcgtggtgctcgcgctgtcgtgactggagccgcagtggcagctgtgctctggcgaaga
agtcctca (SEQ ID NO:116)

[0557] 相应的膜结合蛋白包含以下序列 (表达后切割的信号肽 ***MAPRTLFLLSGALTLTETWA***,跨膜和胞质结构域用斜体标示):

GSISMRYFSTAVSRPGRGEPRIAIVGYVDDTQFVRFSDAASPRMEPRAP
WVEQEGPEYWERETRNAKANAQTDRVNLRTLRLGYYNQSEASSHTLQWMI
GCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCE
AANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVSDH
EATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKAA
VVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVT
GAAVA AVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 117)

[0558] ■ “HLA-G null 3”

[0559] “HLA-G null 3”对应于HLA-G,其中在HLA-G α 3上特异性表达的氨基酸被在其它HLA-I上表达的共有氨基酸取代 (在以下序列SEQ ID NO:119中5个突变的氨基酸用粗体标示)。

[0560] 所述蛋白质在细胞表面表达。用于细胞膜结合表达的DNA序列包含:

[0561] atggctcgtcatggcgcccaggactctgtttctgcttctgtccggcgccctgacctgaccgagacttg
ggccggaagccactcgtatgcggtacttctcgcggcctgtctagaccgggtcggggagaaccccggttcctcgc
atgggctacgtggatgacaccagttcgtgcggttcgacagcgattcagcctgccctcgcattggagccgagagccc
cttgggtggaacaggaaggccggagtagtgggaagaggaaacacgcaacaccaagggccacgctcaaaccgaccg
gatgaacttgcagacgctgcgggatactataaccagtcggagcgtcagccataccctcaatggatgattggc
tgtgacctgggttccgacgggagactgctgcggggctacgagcagtagcctatgacggaaggactacctggccc
tcaacgaagatctccgctcctggaccgctgccgatactgcggcccagatctccaagcgcaaatgcaagcggctaa
tgtcgcgaacagcgaaggccctacctggaaggcacttgcgtggagtggctgcaccgctacctggagaacggaag
gaaatgctgcagagggcagacccccctaagaccatgtcactcaccaccgggtgtccgatcacgaggccaccctga
gggtgctgggactgggattctaccggcgagatcaccctgacctggcaacgggacggcgaagatcagaccaaga
caccgagctcgtggaaccaggcctgcgggtgatggaacctccagaagtgggctgccgtggtggtgccatccggg
gaggagcaacgggtacacttgtcacgtgcagcacgaggactgcctgaacccctgactctgcggtggaagcagagct
ccctccccaccattccgatcatgggaattgtggcgggactcgtggtgctcgcgctgtcgtgactggagccgcagt
ggcagctgtgctctggcgaagaagtccctcagac (SEQ ID NO:118)

[0562] 相应的膜结合蛋白包含以下序列 (表达后切割的信号肽 ***MAPRTLFLLSGALTLTETWA***,跨膜和胞质结构域用斜体标示):

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAP
 WVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMI
 GCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCE
 AANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVSDH
 EATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA
 VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVT
 [0563] GAVA AVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 119)

[0564] ■“HLA-G null 3 2AA”

[0565] “HLA-G null 3 2AA”对应于HLA-G,其中只有2个在HLA-G α 3上特异性表达并被报道与ILT2/ILT4相互作用的氨基酸(HLA-G的F195、Y197)被在其它HLA-I上表达的共有氨基酸取代(突变的氨基酸用粗体标示)。

[0566] 所述蛋白质在细胞表面表达。用于细胞膜结合表达的DNA序列包含:

[0567] atggtcgcatgcccaggactctgtttctgcttctgtccggcgccctgacctgaccgagacttg
 gcccgaagccactcgatgcggtacttctccgcgccgtgtcttagaccgggtcggggagaaccccggttcacgccc
 atgggctacgtggatgacaccagttcgtgcggttcgacagcgattcagcctgccctcgatggagccgagagccc
 cttgggtggaacaggaagggccggagtactgggaagaggaaacacgcaacaccaaggcccacgctcaaaccgaccg
 gatgaacttgacagacgctgccccgatactataaccagtcgagggcgtcgagccatacccttcaatggatgattggc
 tgtgacctgggttccgacgggagactgctgccccgtacgagcagtagcctatgacggaaaggactacctggccc
 tcaacgaagatctccgctcctggaccgctgccgatactgccccagatctccaagcgcaaatgcaagcgggctaa
 tgtcgccgaacagcgaagggcctacctggaaggcacttgctgaggagtgctgaccgctacctggagaacggaaag
 gaaatgctgcagagggcagacccccctaagaccatgtcaccaccatcccgtgtcagaccacgaagccaccctga
 gatgctgggcgctgggcttttacctgccgagatcatcctgacctggcaacgcgacggggaagatcagaccacaaga
 cgtggaacttgtaggagactagaccagccggcgatgggactttccagaaatgggcagccgtggctgctgcccgtcgga
 gaggaacaacgctacacctgtcagtgacgacgaggggtctgccagagcccctgatgctgcggtggaagcagagct
 ccctccccaccattccgatcatgggaattgtggcgggactcgtgggtgctcggcgtgctgctgactggagccgagct
 ggcagctgtgctctggcgaagaagtcctcagac (SEQ ID NO: 120)

[0568] 相应的膜结合蛋白包含以下序列(表达后切割的信号肽 **MAPRTLFLLLSGALTLTETWA**,跨膜和胞质结构域用斜体标示):

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAP
 WVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMI
 GCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCE
 AANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVSDH
 [0569] EATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA
 VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVTG
 AVA AVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 121)

[0570] ■分离的HLA-G α 3结构域(野生型)

[0571] 可溶性蛋白表达为Tev-humanFc融合蛋白(信号肽用粗体标示,Tev用下划线标示,Fc片段用斜体标示),并且不与B2m共表达(“无B2m的分离的HLA-G α 3结构域”):

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYP
AEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA**AVVVPSGEEQRYTCH**
VQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPILEENLYFQ**QGVDKKVEPKSCDKTHTCPPC**
PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 [0572] **VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS**
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO: 122)

[0573] 表达后肽信号被切割,用于筛选测定的纯化的最终蛋白质序列包含以下序列(Fc标签被切割掉):

[0574] **DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYP****AEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA****AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPILEENLYFQ (SEQ ID NO: 123)**

[0575] 细胞膜结合表达的DNA序列:

[0576] atgtccgtgccgacccaagtgtctgggactgctcctgctctggctgactgacgctcgtgtgaccccc
 taagaccacgtcactcatcacctgtgtccgaccatgaagctaccctgagatgctgggacctgggtttctacccc
 gccgagattaccttgacctggcaaggacggcgaagatcagacgcaagacaccgagctcgtggagactcggccag
 cgggggatggaacattccagaaatgggcccagtggtcgtgcccgtccggagaagaacagcggtacacttgccacgt
 gcagcacgaaggcctgccggagcctctgacccttcgctggaagcagtcgagcctccccaccatcccgatcatgggg
 attgtggccggccttgtggtgctggccgagtcgtgaccggagcagctgtggcggtgtcctgtggcggaagaagt
 caagcgat (SEQ ID NO:124)

[0577] 相应的膜结合蛋白包含以下序列(表达后切割的信号肽,跨膜和胞质结构域用斜体标示):

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYP**AEIILTWQRDGEDQT**
QDVELVETRPAGDGTQKWA**AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP**
 [0578] **EPLMLRWKQSSLPTIPI****MGIVAGLVVLA****AVVTGAAVA****AVLWRKKSS**
D (SEQ ID NO: 125)

[0579] ■分离的HLA-G α 3结构域(null) (5个突变的氨基酸用粗体标示)

[0580] 所述蛋白表达为10HisteVAVI标签蛋白(标签和GS接头用斜体标示,信号肽用粗体标示)

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCGGSHHHHHHHHHHGS**SENLYFQGLNDIF**
EAQKIEWHGGGSGSDPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYP**AEITLTWQR**
 [0581] **DGEDQTQDTEL****VETRPAGDGTQKWA****AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPE**
PLTLRWKQSSLPTIPI (SEQ ID NO: 126)

[0582] 表达后肽信号被切割,10His标签在纯化过程中被去除。用于筛选测试的纯化的最

终蛋白质序列包含以下序列(N末端AVI标签和GS接头用斜体标示):

[0583] ***GLNDIFEAQKIEWHGGGSGSDPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWAL***
GFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA
AVV
VPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKQSSLPTIPI (SEQ ID NO:
127)

[0584] ■ B2m

[0585] 筛选测定中使用的和上述的所有HLA-G构建体(除无B2m的分离的HLA-G α 3结构域(野生型)外)均与B2m共表达。为了表达可溶性HLA-G构建体,将B2m与以下序列(信号肽用粗体标示)共表达:

[0586] ***MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP***
SDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVN
HVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO: 128)

[0587] 信号肽在表达后被切割,用于筛选测定的最终纯化的蛋白质包含以下序列:

[0588] ***IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYT***
EFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO: 129)

[0589] 所有膜结合的HLA-G构建体(包括细胞表达的分离的 α 3结构域)都与B2m共表达。用于转染的DNA序列如下:

[0590] atgtcacgctccgtggcactggctgtgctggccctgctctccctgtcgggtcttgaggccatccagag
gactccgaagattcaagtctactcccgccatcctgccgaaacggaaagtccaattttctgaactgctatgtgtcg
ggcttccaccctccgacatcgaagtggacctcctgaagaacggggagcggattgaaaaggtcgagcacagcgacc
tgagcttctcgaaggactggcattctacctcctgtactacactgaattcacccaaccgaaaaggatgagtagcgc
gtgcagagtgaaccacgtgaccttgagccagccgaagatcgtgaaatgggaccgggatatg (SEQ ID NO: 130)

[0591] 与膜结合的HLA-G构建体复合的相应B2m包含序列SEQ ID NO: 129(表达后切割的信号肽MSRSVALAVLALLSLSGLEA)。

[0592] 表达为可溶性蛋白的HLA-G构建体的生产和纯化方法

[0593] ■ 分离的野生型HLA-G α 3结构域(TevHumanFc或TevHFc)的蛋白质表达和纯化

[0594] 按照制造商的方案,使用Expi293TM表达系统(Life technologiesTM)将HLA-G α 3 TevHFc与 β 2m共表达。转染后5天收获细胞,将上清液立即用于纯化。

[0595] 将包含HLA-G α 3 TevHFc+ β 2m蛋白的上清液施加至Hitrap蛋白A柱。用PBS洗涤未结合的蛋白质和污染物,用0.1M柠檬酸缓冲液(pH 2)洗脱HLA-G α 3TevHFc+ β 2m蛋白,用0.5ml 2M Tris PH 8中和峰级分。合并含有纯化的HLA-G α 3TevHFc+ β 2m蛋白的级分,通过将蛋白与tev蛋白酶以1:100的比例在室温下孵育2小时并在4C下孵育2小时来去除HFc标签。将蛋白质浓缩并在用PBS缓冲液平衡的S75 26/60上通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。将含有纯化的HLA-G α 3蛋白的级分合并、浓缩,并将等份在-80°C下贮存直至需要。

[0596] ■ 分离的HLA-G α 3结构域(null)的蛋白质表达和纯化

[0597] 按照制造商的方案,使用Expi293TM表达系统(Life technologiesTM)将10histevAVI HLA-G α 3 null与 β 2m共表达。转染后5天收获细胞,将上清液立即用于纯化。使

用Äkta 净化器 (GE Healthcare) 将包含10histevAVI HLAG α 3 null+B2m蛋白的上清液施加至HisTrap Excel柱 (GE Healthcare)。用Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、500mM NaCl (pH 7.5) 洗涤未结合的蛋白质和污染物。用Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、500mM NaCl (pH 7.5)、500mM咪唑洗脱10mM咪唑和蛋白质。合并含有纯化的10histevAVI HLAG α 3null+B2m蛋白的级分, 通过将该蛋白与tev蛋白酶以1:100的比例在室温下孵育2小时并在4℃下孵育2小时来去除10his标签。通过在Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 平衡的S75 26/60上进行尺寸排阻色谱来进一步浓缩和纯化蛋白质。将含有纯化的AVI HLAG α 3null+B2m蛋白的级分合并, 浓缩, 并将等份在-80℃下贮存直至需要。

[0598] ■与B2m共表达的HLA-G ECD(野生型或null变体)的蛋白质表达和纯化

[0599] 按照制造商的方案, 使用CHO-SXE表达系统共表达5HLA-G ECD(WT或null突变体)与 β 2m。简言之, CHO-SXE细胞在补充有Gibco®GlutaMAX™ (1:1000) 的无血清CD CHO培养基 (Gibco) 中于37℃、含8% CO₂的振荡培养箱中生长, 达到6x10⁶/mL的细胞密度。然后将细胞以1500rpm离心, 重悬于新鲜的ExpiCHO™表达培养基 (Gibco) 中。使用1mg/L的DNA以1:1的HLA-G ECD与 β 2m的比率转染细胞。使用ExpiFectamine™CHO转染试剂盒和OptiPRO™SFM进行转染。转染后96小时收集含有分泌的蛋白质的条件培养基。使用Äkta 净化器 (GE Healthcare) 将过滤的细胞培养物上清液加载到5-ml HisTrap Excel柱 (GE Healthcare) 上。用Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、500mM NaCl (pH 7.5) 洗涤该柱, 并用含有500mM咪唑的相同缓冲液洗脱蛋白质。使用NuPAGE 4-20% Tris-甘氨酸 (Thermo) 和NuPAGE MESSDS运行缓冲液 (Thermo) 通过SDS-PAGE分析含有蛋白质的级分, 用快速考马斯染色 (VWR) 进行染色。在使用Amicon®Ultra-15离心过式滤装置 (Millipore) 浓缩之前, 将纯级分合并。然后使用Superdex 200 16/600柱 (GE Healthcare), 使用Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 作为运行缓冲液进一步纯化蛋白质。

[0600] 通过分析尺寸排阻HPLC和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 评估蛋白质纯度。蛋白质纯度大于97% (通常至少99%)。此外, 通过液相色谱质谱法 (LC-MS) 分析蛋白质, 以确认序列分子量 (MW) 符合预期。

[0601] 产生在细胞表面表达HLA-G构建体的细胞的方法

[0602] ■具有B2m的HLA-G (包括null构建体) 在ExpiHEK293表面上的瞬时表达

[0603] 使用ExpiFectamine™ 293转染试剂 (ThermoFisher Scientific) 以1:1的比例将HLA-G和B2m表达载体共转染到Expi293™悬浮细胞中, 并从24小时开始表达细胞表面蛋白。

[0604] ■HLA-G (包括null构建体) 与B2m在CHO表面上的瞬时表达 (噬菌体淘选)

[0605] 按照制造商的建议, 使用ExpiFectamine™CHO转染试剂盒 (Gibco) 将HLA-G或HLA-G Null 1, 2, 3与B2m表达载体以1:1的比例共转染至专有的CHO-SXE细胞中。48小时后收获在其表面表达HLA-G的细胞。

[0606] ■表达HLA-G的HCT116细胞

[0607] 转染前一天, 将HCT116细胞 (ATCC CCL-247) 以每T 75cm²烧瓶4x10⁶个细胞的密度接种于20ml完全RPMI生长培养基中, 并在37℃、5% CO₂下孵育24小时。转染当天, 除去生长培养基, 用16ml完全生长培养基替换。对于每瓶待转染的细胞, 将20 μ g HLA-G和 β 2m质粒 (1:1的比例) 稀释在不含血清的Opti-MEM® I减血清培养基中。将80 μ l Lipofectamine

LTX®试剂加入到上述稀释的**Opti-MEM®**DNA溶液中,并在室温下孵育30分钟。孵育后,将DNA-Lipofectamine**LTX®**试剂复合物直接加入到每个含有细胞的烧瓶中,并将烧瓶置于37°C的CO₂培养箱中持续22±2小时。

[0608] 1.2.HLA-I构建体

[0609] 按照制造商的方案,使用Expi293™表达系统(Life technologies)将HLA-I构建体与β2m共表达。

[0610] HLA-I共有序列源自已公开报道的HLA-I等位基因的氨基酸序列。用于分析的相关序列信息获自EBI的免疫多态性数据库。该信息被用于产生每种HLA蛋白的等位基因共有序列,其用所有等位基因中发现的最常见残基取代了规范序列中的位置。

[0611] 下面列出了编码共有氨基酸序列并用于转染/细胞膜表达的DNA序列。编码B2m的DNA序列如上所述。分泌的HLA-I蛋白中的信号肽在表达后被去除。

[0612] ■HLA-A

[0613] 用于转染/细胞膜表达的DNA序列:

[0614] atggccgtgatggccccaaggacccttctgctcctcctgtcgggagcgtcgcactgactcagacctg
ggctggctcacactccatgagatacttcttcaacttctgtgtcccggcctggaagaggggagcccaggttcatcgcg
gtcggctacgtggacgacacccagttcgtgcttctgactccgatgccgcctcgcaacgcatggagccgagagctc
cgtggatcgaacaagagggcccggagtactgggaccaggaaactagaaacgtgaaggccacagccagaccgaccg
cgtggatctgggaacctccgcggttactacaatcagtcggaagctggatcccacacagattcagatgatgtacggt
tgcgacgtgggctccgatggacggtttctgcggggtatcggcaggatgcctatgacgggaaggactacatcgct
tgaacgaggacctccggtcatggactgccgagacatggcggcccaaatcaccaagcgcaaatgggaagccgcgca
tgtggcagagcagctgcgggcctacctgagggcacttgcgtggaatggctgcgccgatactggaaaacgggaag
gaaacctgcagcggactgaccacctaagaccacatgaccaccacgccgtgtccgacctgaggccacactgc
ggtgctgggccttgtccttctacctgcccgaatcacctcacttggcaacgcgacggagaggatcagaccaaga
caccgaactggtcgaaactcggcctgcgggagatggaaccttcagaaatgggcccgtgtcgtggtgccgagcgga
caggaacagaggtacacctgtcatgtgcagcacgaggtctgccgaagccccctgacgtgagatgggagctgtcaa
gccagcccactattcccatgtgggcattatcggcggactggtgctgcttggcgccgtcatcaccggtgctgtggt
ggcagccgtcatgtggcgccggaagtccagcgacaggaaggggggctcctacaccaagcggcgtcgagcgatagc
gccagggatccgacgtgtcctcaccgcctgcaaggtc (SEQ ID NO:131)

[0615] 相应的膜结合蛋白包含以下序列:

[0616] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVK
AHSQTDREVLDLTLRGYYNQSEAGSHTIQMMYGCVDGSDGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITK
RKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGQEQRVTCHVQHEGLPKPLTLRWELSSQPTIPIVGI IAGLVLLGA
VITGAVVA VMWRRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGSVDVSLTACKV (SEQ ID NO:132)

[0617] ■HLA-B

[0618] 用于转染/细胞膜表达的DNA序列:

[0619] atgcgcgtgactgccccctcgaaccgtgctcctgctgctctggggagctgtggcactcaccgaaacttg
ggccggatcccacagcatgcggtacttttacactgcgatgtcgcgccctggaagaggggagccacgcttcattgcc
gtgggctacgtcgacgataccagttcgtgcggttgcagacgcgatgcagcctcgccctagagaggaaccagagccc

cgtggatcgaacaggaaggcccggagtactgggatcggaacaccagatctccaagaccaacacgcagacctatcgg
 gaatccctgaggaacctcaggggttactacaaccagtcaggaggccggaagccacacctgcaaaggatgtacgga
 tgcgacgtgggacccgatgggagactcctgcgcggtcacaaccagtagcctacgacgggaaggactacatcgccc
 tgaatgaggacctgtcatcctggaccgcggtgatacagcagccagatcaccagcggaaatgggaggccgccag
 agtggcagaacagctgcgcgctatctggagggttgtgctggaatggctgcggcggtacctgaaaacggaaag
 gaaacctgcagagagcagaccccccaagactcacgtcaccatcaccgatctctgaccatgaagccacctgc
 ggtgttgggccctcgcttctaccggcggaattactctgacatggcagcgggacggagaggaccagaccagga
 caccgagctggtcgaaactcgccctgccggagacaggactttccagaaatgggctgccgtggtggtgccgagcgga
 gaggaacagcgggtacacctgtcacgtgcaacatgagggccttccgaagccccctgactctgcgctgggagccttct
 cccaatcgacgatcccaattgtcggcatcgtggccggtctggctgtgcttgcggtggtggtcattggcgcggtggt
 ggctactgtgatgtgcccgcaagagctcaggaggggaaggcggtcctactcgcaagccgctcctcggactcc
 gccaaggatccgatgtctcattgaccgcc (SEQ ID NO:133)

[0620] 相应的膜结合蛋白包含以下序列:

[0621] GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWRNTQISK
 TNTQTYRESLRNLRGYNQSEAGSHTLQRMYGCDVGPDRLLRGHNQYAYDQKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQ
 RKWEAARVAEQLRAYLEGLCVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
 GEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSQSTIPIVIGIVAGLAVLAV
 VVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTA (SEQ ID NO:134)

[0622] ■ HLA-C

[0623] 用于转染/细胞膜表达的DNA序列:

[0624] atgcgcgtgatggccccctgcaccttgattctgctcctgtccggtgcccttgctctcaccgagacttg
 ggctgctcgcactccatgcggtacttctacaccgccgtgtctaggccgggaaggggagagccggttcatcgcc
 gtgggctacgtcgacgataccagtttgtgcggttcgacagcagatgccgcaagccccagaggagagcctagagctc
 cgtgggtcgaacaggaggccccgagtactgggaccgggaaaccagaagtacaagcggcagggcacaagcggatag
 agtgtccctgcggaacctccgggttactacaaccagtcagaagccggttcccatactctgcaacggatgtacggt
 tgcgaccttgaccggcagcagactgctccggggtacgatcagtcgcctacgacgggaaggactacattgccc
 tgaacgaggacctccggtcctggactgcggcagataccgcggcgagatcaccagcggaaatgggaagcggcccc
 agaagcagagcagctgagagcctatctggagggcacctgtgtcgagtggctgagcgctatttggaaaacgggaag
 gagactctgcagagagcggaaaccccccaagactcacgtgaccaccacctgtgtccgacctgaagccacctgc
 gctgttgggccctggggttctacctgccgaaatcacctgacctggcaaaaggacggagaggaccagaccagga
 caccgaactggtggagactcggcccgtggagatgggaccttccaaaaatggccgctgtggtcgtgccatccggg
 gaggaacaacggtacacttgccacgtgcagcatgagggactcccggaaccgtgacacttcgctgggaaccgagca
 gccagccaacgatccccattgtgggcatcgtggccggactcgagtgctggccgtgctggctgtcctgggagccgt
 gatggccgctcgtgatgtgccggcgcaagtcgtccggcggaaggaggagcagctgctcccagccgctcctcgaat
 tcggcccagggtcagacgaatcactgatcgctgcaaggcg (SEQ ID NO:135)

[0625] 相应的膜结合蛋白包含以下序列:

[0626] CSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK
 RQAQADRVSLRNLRGYNQSEAGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDQKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
 RKWEAAREAEQLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD

GEDQTQDTELVETRPAGDGTFFQKWA AVV VPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQPTIPIVGIVAGLAVLAV
LAVLGAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDSLIACKA (SEQ ID NO:136)

[0627] ■ HLA-E

[0628] 用于转染/细胞膜表达的DNA序列:atggctgacgggacgttgctcctcctgttgccgaagcc
ctggcgcttactcaaacctgggccggatcgactccctgaagtatttccacacctccgtgtcaagaccggtagag
gcgaacctcggttcatctccgtgggctacgtggacgacactcagttcgtgctcctcgacaatgatgccgcatcgcc
tcggatggtgcccagagcccccttggatggaacaggaggatcggagtactgggaccgagactcggtcagcccgc
gatactgcccagatTTTTCCGCGTCAACCTGAGGACCTGAGGGGCTACTATAACCAGAGCGAAGCGGGTTCCATA
CCCTCCAATGGATGCATGGCTGCGAAGTGGTCCAGACAGCGCTTCTTTCGGGGCTACGAACAGTTTGCCTACGA
TGGAAAGGATTACCTGACCTCAACGAGGACCTCCGCTCTTGGACC GCCGTGGACTGCGGCCAAATCTCCGAA
CAGAAGTCGAACGACGCCTCAGAGGCGGAGCACCAGCGAGCTTACCTTGAGGACACTTGCCTGGAGTGGCTGCACA
AGTACCTGGAAAAGGAAAGGAAACCTCCTGCACCTGGAGCCTCCAAGACCATGTCACCCACCACCGATCTC
CGACCACGAAGCTACCTCCGGTGTGGGCCCTGGGCTTTTACC CGGGGAAATCACCTGACGTGGCAGCAGGAC
GGGGAGGGACACACCAGGACACCGAAGTGGTGGAGACTAGACCAGCCGGCGATGGGACTTTCAGAAATGGGCCG
CTGTGGTAGTGCCAGCGGCGAAGAACAGCGGTACACATGCCATGTGCAACACGAGGGACTGCCGAGCCTGTGAC
CCTTCGGTGAAGCCGGCCTCACAACCGACCATCCCGATTGTCGGAATTATCGCCGGACTGGTGTGCTCGGGTCC
GTCGTGTCGGGAGCAGTGGTGGCGCTGTGATCTGGCGGAAGAAGTCCAGCGGAGGAAAGGGGGTTCCTACTCGA
AAGCGGAGTGGAGCGATAGCGCACAGGGATCCGAGAGCCACTCGCTG (SEQ ID NO:137)

[0629] 相应的膜结合蛋白包含以下序列:

[0630] GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFNDNAASPRMVP RAPWMEQEGSEYWDRETRSAR
DTAQIFRVNLRTRLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPDRRFLRGYEQFAYDGDYDLTLNEDLRSWTAVDTAAQISE
QKSNDASEAHRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQD
GEGHTQDTELVETRPAGDGTFFQKWA AVV VPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTIPIVGIIAGLVLLGS
VVGAVVA AVIWRKSSGGKGGSYSKA EWSDSAQGSESHSL (SEQ ID NO:138)

[0631] ■ HLA-F

[0632] 用于转染/细胞膜表达的DNA序列:

[0633] atggcaccacggctcgttgctcctgctcctgtcgggcgctccttgccctcaccgacacttgggccggcag
ccattctcttcggctacttctccaccgctcagcagaccgggaaggggagaaccgcggtatatcgcggtggaatat
gtggacgatacccagttcctcgggttcgactccgatgccgcgattccaaggatggagcccagagaacctgggtgg
agcaggaagggccgactactgggaatggaccaccggctacgccaaggccaacgctcagaccgatagggtggcgct
gcgcaacctcttgcggcggtacaatcagtcagaagcgggttcccacacgctgcaaggatgaacggctgcgacatg
ggacctgacggtagactgctccgaggctaccaccaacacgcgtacgatggaaaggactacattagcctgaacgagg
atctgcggctcctggactgcggccgacactgtggcccaaatcaccagcgcttttacgaggcagaagaatacgccga
agaattccgcacctacctggagggcgaatgcttggagcttctgcggcgctacctggaaaacgggaaggagactctg
cagagagccgacctccaaggccatgtggcccaccacctatctcggaccatgaggcgacctgcggtgttggg
ccctggggttctaccggctgagattacctgacctggcaacgcgacggagaggagcagaccaggacaccgaact
cgtggaaccagaccggccggagatggaacattccagaaatgggccgctgtcgtggtgccctccggagaggaacag
cgctacacttgccacgtgcagcacgaggactgccacagccccctgatcctgcgctgggagcagtcacctcaaccga
ctatccctatcgtcggatcgtggctggtctggtggtgctcggagccgctcgtgactggggcagtggtggcagccgt

gatgtggcgcaagaagtctcagaccggaacaggggcagctactcccaagccgccgtc (SEQ ID NO:139)

[0634] 相应的膜结合蛋白包含以下序列:

[0635] GSHSLRYFSTAVSRPGRGEPRYIAVEYVDDTQFLRFDSDAAI PRMEPREPWVEQEGPQYWEWTTGYAK
ANAQTDRVALRNLLRRYNQSEAGSHTLQGMNGCDMPDGRLLRGYHQHAYDYGKDYISLNEDLRSWTAADTVAQITQ
RFYEAEEYAEFFRTYLEGECELELLRRYLENGKETLQRADPPKAHVAHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEEQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPQPLILRWEQSPQPTIPIVGIVAGLVVLGA
VVTGAVVAAMWRKSSDRNRGSYSQAAV (SEQ ID NO:140)

[0636] 1.3. ILT2/ILT4构建体 (Fc融合物) :

[0637] ■ ILT2表达为可溶性ILT2 ECD-兔Fc融合蛋白 (信号肽用粗体标示,兔Fc用下划线标示) :

[0638] **MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQ**
GGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPISITWEHAGRYRCYYG
SDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDG
FSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNS
PYEWSLPSDLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFV
LYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNSSE
WSAPSDPLDILIAGQFYDRVLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFL
TKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYL
[0639] **LTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLE**
KTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQD
DPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFK
CKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGF
YPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDV
FTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 141)

[0640] 用于筛选测定的纯化的最终蛋白质序列包含以下序列:GHLPKPTLWAEPGSVITQGSP
VTLRCQGGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPISITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTG
AYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYR
CYAYDSNSPYEWSLPSDLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGA
QPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVLSVQPGPTVASGENVTLLCQS
QGWMQTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSG
GPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLE**KTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRT**
PEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPI
EKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSFLYS
KLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO:142)

[0641] ■ ILT4表达为可溶性ILT4 ECD-兔Fc融合蛋白 (信号肽用粗体标示,兔Fc用下划线标示) :

MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQG
SLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSR
ARWSELS DPLVLMVTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGFI
LCKEGEEEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPY
VWSSPSDLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFVL
YKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEC
SAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKA
 [0642] **GAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPV TSAHAGTYRCYGLNSDPYLLSHP**
SEPLELVVSGPSMGSSPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLELEK
TVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDD
PEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKC
KVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY
PSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVF
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 143)

[0643] 用于筛选测定的纯化的最终蛋白质序列包含以下序列: **QTGTIPKPTLWAEPDSVITQG**
SPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELS DPLVLMVT
GAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSH
RCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGR
QPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQ
SWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPV TSAHAGTYRCYGLNSDPYLLSHPSEPLELVVSGPS
MGSSPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLELEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKAL
PAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDSGSY
FLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 144)

[0644] ILT2rbFc和ILT4rbFc的表达与纯化

[0645] 按照制造商的方案,使用Expi293™HEK表达系统(Life technologies™)通过瞬时转染来表达蛋白质。转染后5天收获细胞,将上清液立即用于纯化。

[0646] 将包含ILT2rbFc或ILT4rbFc蛋白的上清液施加至Hitrap蛋白A柱。用PBS洗涤未结合的蛋白质和污染物,用不含内切酶的0.1M柠檬酸缓冲液(pH 2)洗脱ILT2rbFc或ILT4rbFc蛋白,用0.5ml 2M Tris PH 8中和峰级分。将含有纯化的蛋白质的级分合并并浓缩,使用Cytiva HyClone™磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为运行缓冲液,在S20026/60上通过尺寸排阻色谱进一步纯化。在-80℃下贮存之前,将含有纯化的ILT2rbFc或ILT4rbFc蛋白的级分合并、浓缩并等分

[0647] 实施例2:通过用HLA-G免疫产生抗体

[0648] 由于与针对HLA-G的抗体的生产相关的特殊挑战(诸如与其它HLA-I分子的高度同源性,能够阻断HLA-G与其抑制性受体之间相互作用的抗体的鉴定)以及为了鉴定可用于治

疗的抗体,必须开发特殊的发现策略(包括特殊的筛选和测试策略),并在下文中进行描述。

[0649] 免疫和筛选策略

[0650] 用表达与B2m共表达或不与其共表达的不同形式的HLA-G的同基因细胞免疫不同物种(包括小鼠和兔子)的许多动物。注射3-5次后,处死动物并收获PBMC、脾脏、骨髓和淋巴结。监测血清与所用免疫原的结合。

[0651] 建立记忆B细胞培养物,首先在TTP Labtech Mirrorball系统(平板读取器)或Intellicyt iQue(流式细胞术)上,在多重免洗测定中筛选上清液的高于与无关对照的结合的结合HLA-G的能力。在用无关对照蛋白质、内部产生的HLA-G蛋白上和/或使用在细胞表面瞬时表达目标构建体(HLA-G、HLA-G Nu11 1,2,3、HLA-G Nu113)的EXPI293 HEK筛选培养物。对蛋白质试剂进行了生物素化,使得链霉抗生物素蛋白能够捕获到珠粒上。荧光标记的物种特异性抗Fc二抗用于检测测试抗体的测定。

[0652] 在初级筛选中从总共18个B细胞培养实验(每个实验包含100-300个平板)中鉴定出约3800个HLA-G特异性阳性命中。然后在结合测定中对来自初级筛选的阳性上清液进行进一步表征(可溶性分离的 α 3结构域null,和细胞表达的分离的 α 3结构域,HLA-G Nu11 1, 3,HLA-G Nu113 2AA)。

[0653] 使用荧光聚焦法(fluorescent foci method)和与HLA-G ECD蛋白的结合,对具有理想特征的孔进行可变V区回收。

[0654] 同时,还使用荧光聚焦法直接筛选来自骨髓和淋巴结的浆细胞的结合人HLA-G或特别是 α 3结构域的能力。此处,在固定于链霉抗生物素蛋白珠粒上的生物素化的人HLA-G ECD或分离的野生型HLA-G α 3结构域上挑选出分泌HLA-G特异性抗体的B细胞。使用山羊抗物种Fc-FITC缀合物显示试剂。挑选出大约1700个直接灶。

[0655] 对挑选的细胞进行逆转录(RT)和PCR后,产生了编码抗体的V区的‘转录活性PCR’(TAP)产物,并将其用于瞬时转染EXPI293HEK细胞。在以下测定中测试了包含重组抗体的所得TAP上清液:

[0656] ●细胞与如上所述的HLA-G和null突变体的结合有助于建立结构域结合(多重iQue)

[0657] ●ILT2阻断测定

[0658] ●通过Biacore测量亲和力

[0659] 然后将感兴趣的TAP产物的重链和轻链可变区基因对克隆为物种匹配的全长IgG抗体,并在瞬时表达系统中重新表达。然后在上述测定中重新测试重组克隆的抗体。

[0660] 克隆并登记了总共109个V(可变)区,其中只有30个是HLA-G特异性的,不与其它HLA-I结合,其中只有9个显示出对HLA-G ILT2相互作用的阻断。所有这些抗体都结合HLA-G的 α 3结构域,9种特异性和阻断性抗体中的5种具有不同的序列,并被用于进一步测试(列于下表3中)。

[0661] 表3:选择用于进一步分析的通过免疫接种产生的抗体

抗体 ID	衍生/免疫原
HLA-G01	直接病灶, 骨髓/ Rab9 细胞 + hHLA-G
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	B 细胞培养物, 脾/ Rab9 细胞 + hHLA-G
[0662] HLA-G03	B 细胞培养物, 淋巴结/ Rab9 细胞 + hHLA-G
HLA-G04	B 细胞培养物, 淋巴结/ Rab9 细胞+ hHLA-G+ B2m
HLA-G05	直接病灶, 骨髓/ Rab9 细胞 + hHLA-G

[0663] 基于某些抗体的特性, 对其进行人源化活动, 并在表征测定法中进一步评估, 包括似乎是最佳抗体的HLA-G02和HLA-G01。实施例4中描述了VR12389的人源化。HLA-G03也是人源化的, 然而, 人源化抗体的高亲和力并没有转化为功能活性的提高, 这将在进一步的实施例中描述。

[0664] 对纯化的抗体进行的另外测定包括基于细胞的特异性测定、ILT4阻断测定、ADCC。在下面的其它实施例中描述了针对纯化的IgG1抗体生成的数据。

[0665] 在本公开中, 抗体ID HLA-G02是指人源化VR12389gL2gH16IgG1抗体。

[0666] 导致抗体12389的发现的免疫接种方法

[0667] 瞬时表达HLA-G的Rab9细胞

[0668] 在5-层细胞培养瓶中, 将Rab9成纤维细胞培养在RPMI培养基+10% FBS和1% 谷氨酰胺中。当细胞达到90-100% 汇合时, 去除培养基, 用100ml PBS洗涤细胞, 使用100ml Accutase从细胞培养瓶中去除细胞, 并在室温下孵育10-15分钟。将收获的细胞离心并以 5×10^7 个细胞/ml重悬于Earles平衡盐缓冲液中。以 $250 \mu\text{g}$ DNA/ml细胞向细胞中加入HLA-G DNA。然后将Rab9+HLA-G DNA混合物以 3×10^7 个细胞/比色皿转移至电穿孔比色皿。然后使用我们的内部电穿孔装置(Zapper) 和Gene Pulser Xcell ShockPod比色皿室(BIORAD) 用150-170V电 (20ms 5.5Amps) 对比色皿施加脉冲。电脉冲后, 将细胞快速转移到温热的Rab9培养基中, 并放回新的5层细胞培养瓶中。

[0669] 所有细胞电穿孔并转移到新的培养瓶中后, 然后在 37°C 、5% CO_2 下将其孵育24小时, 然后使用Accutase (如前所述) 收获细胞, 计数, 并在 -80°C 冷冻机中冷冻到冷冻瓶中, 每个冷冻瓶中有 2×10^7 个细胞。24小时后, 将冷冻的细胞转移到液氮杜瓦瓶中长期贮存。

[0670] 冷冻前, 通过用缀合有Sigma APC的抗HLA-G抗体 (克隆MEM/G9) 在 4°C 染色1小时并在FACS Calibre上运行通过样品, 测试 5×10^5 个转染细胞的HLA-G表达。

[0671] 在免疫当天, 对于每次注射, 将1小瓶转染的细胞在 37°C 下快速解冻, 并在50ml PBS中洗涤两次, 然后重悬于 $500 \mu\text{l}$ PBS中, 用于施用到兔子中。

[0672] 将编码全长HLA-G的DNA序列 (SEQ ID NO:111) 用于电穿孔 (为在哺乳动物细胞中表达而优化的HLA-G的核酸序列)。

[0673] 免疫

[0674] 用 2×10^7 个如上所述制备的在细胞表面瞬时表达HLA-G的Rab9兔成纤维细胞皮下免疫一只雌性新西兰白兔。在用细胞免疫的同时,将等体积的完全弗氏佐剂在单独的部位皮下注射到兔子体内。

[0675] 以14天的间隔对兔子进行两次加强注射,其中Rab9兔成纤维细胞在细胞表面瞬时表达HLA-G。每次免疫前从耳静脉抽取肝素化的血液(200 μ l)。在台式离心机中以10,000rpm旋转5分钟后,从放血液中收集血清,并在-200 $^{\circ}$ C下冷冻。在用制备的脾脏、淋巴结、骨髓和外周血单核细胞的单细胞悬浮液进行最后一次加强后14天终止试验,并在10% DMSO/FCS中于-80 $^{\circ}$ C下冷冻,直至需要用于B细胞发现目的。还在终止时采血,并如前所述制备血清。

[0676] B细胞回收和筛选

[0677] VR12389是从脾脏的记忆B细胞培养中发现的。将脾细胞在96孔板中用饲养细胞系和补充剂在37 $^{\circ}$ C培养5天。然后通过免洗多重流式细胞测定法(Intellicyt iQue)对该培养物进行筛选。将含有分泌抗体的培养物上清液与上述筛选试剂(内部产生的HLA-G蛋白和细胞表达的HLA-G构建体:HLA-G、HLA-G Null 1,2,3、HLA-G Null3)混合。对在筛选中使用的筛选细胞进行差异染色以允许对不同群体进行门控,并且使用DyLight 405标记的山羊抗兔抗体作为二抗来鉴定抗体结合。

[0678] 命中被定义为具有特异性(即不与HLA-G Null 1,2,3突变体或无关对照转染物结合)的HLA-G结合物,。将造成命中的B细胞回收到原始培养孔中,然后使用如前所述的荧光聚焦法。

[0679] 在聚焦步骤之后,用于两个导联(lead)的所挑选的细胞遵循相同的工作流程。挑选的细胞的逆转录(RT)和PCR产生编码抗体的V区的‘转录活性PCR’(TAP)产物,其用于瞬时转染EXPI293 HEK细胞。在进行克隆抗体和大规模表达之前,对所得的含有重组抗体的TAP上清液进行细胞结合、ILT2阻断和亲和力表征。

[0680] 如上所述,用表达与B2m共表达或不与其共表达的不同形式的HLA-G的同基因细胞免疫不同物种(包括大鼠、小鼠和兔子)的许多动物,但并不是所有的免疫接种策略都能成功产生针对HLA-G的抗体,或者当确认产生了针对HLA-G的抗体时,所述抗体对HLA-G不是特异的和/或不能阻断,或者不能结合细胞表面表达的HLA-G蛋白。值得注意的是,用表达分离的 α 3结构域或表达兔-人HLA-G嵌合体的Rab9细胞免疫接种兔子没有产生任何针对HLA-G的抗体。因此,本发明提供了一种免疫接种方法,该方法对发现在治疗中有用的抗HLA-G抗体特别有用,所述方法包括用在细胞表面瞬时表达HLA-G的全长序列的Rab9兔成纤维细胞免疫接种兔子。

[0681] 实施例3:通过噬菌体展示产生抗体

[0682] 为了鉴定在治疗中有用的抗体,在免疫接种活动的同时开发了第二种方法,以试图从噬菌体展示文库中鉴定在治疗中有用的特异性结合HLA-G的抗体。同样,由于与治疗中有用的HLA-G抗体的生产相关的特殊挑战,开发了特殊的筛选和测试策略。

[0683] 噬菌体展示文库

[0684] 使用不同构建体,利用三个人原始组合scFv噬菌体文库获得了结合HLA-G的抗体,目的是获得对HLA-G的选择性结合物,而与其它HLA-I无结合或结合最少。使用三轮或四轮选择(仅使用在细胞表面表达的重组HLA-G或随后在最后一轮中使用重组HLA-G胞外结构域

蛋白)来对文库进行生物淘选。在最后一轮中包括对HLA-G Nu11 1,2,3(可溶性蛋白或细胞表达的)的任选的扣除步骤,以富集HLA-G特异性结合物。

[0685] 简言之,对细胞的生物淘选包括第一轮在ExpiCHO中共转染编码人HLA-G和 β 2m的DNA构建体,或随后几轮在Expi293 HEK中共转染编码人HLA-G和 β 2m的DNA构建体,以及将这些细胞与先前在非转染的细胞或HLA-G Nu11 1,2,3转染的细胞上耗竭的封闭噬菌体病毒体一起孵育。通过将封闭噬菌体颗粒与平板包被的HLA-G或溶液中的生物素化的HLA-G一起孵育,然后在链霉抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白磁珠上进行捕获,来进行对蛋白质的生物淘选。在使用PBS Tween洗涤几次后,洗脱靶标结合的噬菌体并通过感染大肠杆菌TG1重新扩增所述噬菌体。

[0686] 噬菌体筛选

[0687] 在最后一轮选择后,通过在链霉抗生物素蛋白包被的板上捕获的生物素化的HLA-G ECD上进行ELISA,筛选了1692个单克隆拯救噬菌体。通过缀合有HRP的抗M13 pVIII外壳蛋白抗体检测结合。生物素化的HLA-G Nu11 1,2,3用于评估这些单克隆噬菌体克隆的特异性。对359个目标结合物进行测序,并基于其可变重链CDR3序列基序分析多样性。然后在哺乳动物表达载体中将81个独特的克隆重组为scFv-兔IgG Fc融合物以进一步表征。

[0688] HLA-G选择性结合物的进一步表征

[0689] 将scFv-Fcs在Expi293 HEK中表达。使用IntelliCyt iQue Screener Plus通过流式细胞术测试了它们的结合和特异性。将稀释的含抗体上清液加入共转染有人HLA-G或HLA-G和 β 2微球蛋白的ExpiHEKs中。用Fc片段特异性荧光抗体检测结合。

[0690] 21种不与HLA-G Nu11 1,2,3+B2m结合的HLA-G细胞结合物被进一步表征为scFv-Fc和/或在重组为全长人IgG1后,通过SPR、ILT2阻断测定来测定其与HEK上表达的HLA-A、-B、-C、-E、-F的结合,以及通过流式细胞术测定其与JEG3细胞的结合。

[0691] 14种抗体被证实对HLA-G具有高度特异性,与其它HLA-I分子无结合或结合最少,其中只有6种抗体被发现能阻断HLA-G与ILT2之间的相互作用。

[0692] 在6种特异性和阻断性抗体中,3种具有不同的序列,并被用于进一步测试(HLA-G06、HLA-G07、HLA-G08)。

[0693] 对纯化的抗体进行的另外测定包括基于细胞的特异性测定、ILT4阻断测定、ADCC。在下面的其它实施例中描述了针对纯化的抗体生成的数据。

[0694] 实施例4:抗体12389的人源化

[0695] 通过将兔V区的CDR移植到人种系抗体V区框架上,将抗体12389人源化。为了恢复抗体的活性,来自兔V区的许多框架残基也被保留在人源化序列中。使用Adair等人(1991)(W091/09967)概述的方案选择这些残基。图2和图3显示了兔抗体(供体)V区序列与人种系(受体)V区序列的比对,以及设计的人源化序列。从供体序列移植到受体序列的CDR是如通过Kabat(Kabat等人,1987)定义的,但CDR-H1除外,在所述CDR-H1中使用了组合的Chothia/Kabat定义(参见Adair等人,W091/09967)。

[0696] 对于抗体12389,选择人V区IGKV1D-13加上IGKJ4 J-region(IMG, <http://www.imgt.org/>)作为轻链CDR的受体。人源化移植物变体中的轻链框架残基均来自人种系基因,除了来自包括残基3和70的组的0个、1个或2个残基,其中供体残基缬氨酸(V3)和谷氨酰胺(Q70)(参考SEQ ID NO:7)(兔VL)分别得到保留。

[0697] 选择人V区IGHV3-66加上IGHJ4 J-region (IMGT, <http://www.imgt.org/>) 作为抗体12389的重链互补决定区的受体。与许多兔抗体一样,抗体12389的VH基因比选择的人受体短。当与人受体序列比对时,抗体12389的VH区的框架1缺少N末端残基,所述残基保留在人源化抗体中(图3)。12389兔VH区的框架3在 β 折叠链D与E之间的环中也缺少两个残基(75和76,参考SEQ ID NO:11,兔VH):在人源化移植变体中,缺口被来自选择的人受体序列的相应残基(赖氨酸75,K75;天冬酰胺76,N76)填充。人源化移植变体中的重链框架残基均来自人种系基因,除了来自包括残基24、48、49、71、73、78和96的组的一个或多个残基,其中供体残基缬氨酸(V24)、异亮氨酸(I48)、甘氨酸(G49)、赖氨酸(K71)、丝氨酸(S73)、缬氨酸(V78)和甘氨酸(G96)(参考SEQ ID NO:11)分别得到保留。

[0698] 表达变体人源化抗体链及其组合,并评估其相对于亲本抗体对人HLA-G的结合亲和力。

[0699] 在Expi293细胞中的表达

[0700] 编码变体重链和轻链V区序列的基因由ATUM (Newark, CA) 通过自动合成方法设计和构建。为了在哺乳动物细胞中瞬时表达,将人源化轻链V区基因克隆到轻链表达载体pMhCK中,所述载体含有编码人 κ 链恒定区(Km3同种异型)的DNA。将人源化重链V区基因克隆到人 γ -4重链表达载体pMhg4PFL中,该载体含有编码具有铰链稳定突变S228P的人 γ -4重链恒定区的DNA(Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D.G., Roberts G., Pedley B. and Adair J.R. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol. Immunol.* 1993, 30 (1): 105-8), 或克隆到 γ -1重链表达载体pMhg1FL中,该载体含有编码人 γ -1重链恒定区(G1m17, 1种同种异型)的DNA。使用ExpiFectamine™ 293转染试剂(A14525, ThermoFisher Scientific)将所得重链和轻链载体共转染到Expi293™悬浮细胞中,并表达人源化重组IgG4P和IgG1抗体。

[0701] 通过SPR进行的亲和力测量

[0702] 如下所述,测定形式是通过固定的抗人IgG Fc特异性抗体捕获抗HLA-G IgG,然后在捕获的表面上滴定HLA-G。

[0703] 使用Biacore T200 (GE Healthcare Biosciences AB) 通过表面等离子体共振测定抗HLA-G IgG结合HLA-G的亲和力。测定在25°C下进行。将Fc特异性的affinipure F (AB')₂片段山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在Series S CM5传感器芯片 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 上,达到约6000反应单位 (RU) 的水平。HBS-EP⁺缓冲液 (10mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 表面活性剂P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) 用作运行缓冲液,流速为10 μ L/min。通过活化和灭活适当的流动池来制备参考表面。

[0704] 将注射10 μ L浓度为0.15至0.7 μ g/mL的抗HLA-G IgG用于被固定的抗人IgG Fc捕获。以30 μ L/min的流速在50nM的捕获的抗HLA-G IgG上方滴定人HLA-G ECD+B2m,持续60秒,随后解离150秒。通过注射10 μ L的40mM HCl,然后注射5 μ L的5mM NaOH,以10 μ L/min的流速再生表面。

[0705] 使用Biacore T200评价软件(3.0版),使用与局部R_{max}拟合的1:1结合,分析背景扣除结合曲线。

[0706] 在测定开始和结束时分析抗体,所述抗体显示出良好的精确度。如表4和表5中所概括的,生成所有样品的高质量数据。

[0707] 表4:12389(嵌合兔V区/人Fc)和表达为hIgG4P的人源化移植物的亲和力数据

[0708]

抗体 12389	轻链供体 残基	重链供体残基	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	亲和力 (KD) nM
12389 (嵌合兔 V区/人Fc)	-	-	9.49E+05	9.20E-03	9.69
12389gL1gH1	V3, Q70	V24, I48, G49, K71, S73, V78, G93	8.48E+05	6.78E-03	7.99
12389gL2gH1	V3	V24, I48, G49, K71, S73, V78, G93	9.28E+05	7.08E-03	7.63
12389gL3gH1	-	V24, I48, G49, K71, S73, V78, G93	8.45E+05	6.97E-03	8.25
12389gL2gH4	V3	I48, G49, K71, S73, V78, G93	8.88E+05	7.18E-03	8.09
12389gL2gH5	V3	V24, G49, K71, S73, V78, G93	8.17E+05	1.01E-02	12.4
12389gL2gH6	V3	V24, I48, K71, S73, V78, G93	8.39E+05	1.04E-02	12.5
12389gL2gH8	V3	V24, I48, G49, S73, V78, G93	7.87E+05	1.21E-02	15.4
12389gL2gH9	V3	V24, I48, G49, K71, V78, G93	8.50E+05	6.03E-03	7.09
12389gL2gH11	V3	V24, I48, G49, K71, S73, G93	8.50E+05	9.07E-03	10.7
12389gL2gH12	V3	V24, I48, G49, K71,	8.44E+05	6.24E-03	7.39

		S73, V78				
[0709]	12389gL2gH13	V3	I48, G49, K71, V78, G93	9.56E+05	6.32E-03	6.61
	12389gL2gH14	V3	I48, G49, K71, S73, V78	8.75E+05	6.64E-03	7.58
	12389gL2gH15	V3	V24, I48, G49, K71, V78	8.96E+05	5.67E-03	6.33
	12389gL2gH16	V3	I48, G49, K71, V78	9.02E+05	5.46E-03	6.06
	12389gL3gH16	-	I48, G49, K71, V78	8.33E+05	5.60E-03	6.72

[0710] 表5:两个实验中的12389(嵌合兔V区/人Fc)和表达为hIgG1的12389gL2gH16的亲合力数据

抗体 12389	轻链供体残基	重链供体残基	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	亲和力 (KD) nM
12389(嵌合兔V区/人Fc)	-	-	8.41E+05	9.10E-03	10.80
[0711] 12389gL2gH16 IgG1	V3	I48, G49, K71, V78	7.29E+05	3.48E-03	4.78
12389(嵌合兔V区/人Fc)	-	-	7.82E+05	9.18E-03	11.70
12389gL2gH16 IgG1	V3	I48, G49, K71, V78	6.72E+05	3.64E-03	5.42

[0712] 如表4所示,除12389gL2gH5、12389gL2gH6、12389gL2gH8、12389gL2gH11外,所有移植物的KD均小于10nM,且小于对于亲本12389(嵌合兔V区/人Fc)所测量的KD。

[0713] 如通过表面等离子体共振所测量的,移植物12389gL2gH16(其保留了VH框架供体残基I48、G49、K71和V78以及VL框架供体残基V3)与人HLA-G的结合亲和力最高,并且在以不同形式诸如IgG4P和IgG1(表4-5)表达时保留了功能性,并被选择用于进一步表征。

[0714] 实施例5:HLA-G01-HLA-G08的表达和纯化

[0715] 将抗体在用编码HLA-G01-HLA-G08抗体的LC和HC的DNA载体(LC:HC的比例为1:1)转染的CHO细胞中瞬时表达为IgG1,并根据公知的方法在蛋白A亲和和色谱上纯化以用于进一步测试。

[0716] 使用纳米液滴通过读取280nm处的吸光度来测定蛋白质浓度,并通过分析尺寸排阻HPLC来测定纯度。使用分析尺寸排阻色谱和SDS Page电泳测定单体含量。使用Charles River **Endosafe**[®]LAL试剂盒技术和**Endosafe**[®]nexgen-PTS读数器测定内毒素水平,

其中<1EU/ml的水平为可接受的质量。

[0717] 最终纯化的样品纯度很高,单体含量>98%。通过完整质谱分析最终纯化的样品,以确认重链和轻链质量、预期的修饰和身份。

[0718] 实施例6:非岩藻糖基化的HLA-G02抗体的产生

[0719] 产生KO FUT8 CHOSXE/DG44细胞的方法

[0720] 设计RNA引导序列(gRNA)以敲除包含编码 $\alpha 1, 6$ 岩藻糖基转移酶(FUT8)活性部位的序列的2个外显子。使用Benchling软件设计gRNA 2-8(总共7个),以在正向和反向链中产生多个缺失,最大的可能缺失为4kb,使用引导序列作为库以最大化可能的敲除。gRNA的序列提供于下表6中。

[0721] 表6:gRNA序列

名称	序列
FUT8-gRNA-2	GAUGGAGGCUGUCUACAAUG
[0722] FUT8-gRNA-3	GUCAGGGCUGUAGCACACUG
FUT8-gRNA-4	GAAGUGGUAGUAACUUUACA
FUT8-gRNA-5	AUUAGUAUCCCUAGUCAUGG
FUT8-gRNA-6	UGGUACACCUAGUACUACUG
[0723] FUT8-gRNA-7	UGACUAUACAAAUUUCUGGG
FUT8-gRNA-8	AGUCAACAAUGUCUUAGACA

[0724] 如表7中所提供的,以最终pmol的终浓度制备gRNA库。将cas09(ThermoFisher)制备成表7中提供的所需浓度。

[0725] 制备 3×10^6 个CHO SXE/DG44细胞用于核转染,在以 $\times 100g$ 离心8分钟后,在PBS中洗涤细胞,再次 $\times 100g$ 离心8分钟,并重悬于 $100 \mu l$ 核转染溶液中,得到 $3 \times 10^4 / \mu l$ 的细胞。如下表7所示制备转染前混合物,将其在室温下无细胞放置10-60分钟以允许Cas09/gRNA复合物形成。

[0726] 表7:转染前混合物

	9:1 的比例	6:1 的比例	3:1 的比例	阴性	模拟物
核转染溶液	60μl	60μl	60μl	60μl	60μl
[0727] gRNA	20μl (90pmol)	20μl (60pmol)	20μl (30pmol)	-	-
Cas09 (3.22mg/ml)	3.33μl	3.33μl	3.33μl	3.33μl	-

[0728] 按照制造商的说明,在进行核转染(nucleofector 4D,Lonza)之前,向复合物中加入 $16.67 \mu l$ 细胞(3×10^4 个细胞/ μl)。加入 $900 \mu l$ 预温热的CD CHO培养基回收细胞,将其置于垂直放置的小的T25烧瓶中。在 $37^\circ C$ 、5% CO_2 下放置24小时后,一旦细胞已经恢复并正在分

裂,就用新鲜的预温热的CD CHO(加入抗生素青霉素、链霉素和两性霉素B以降低污染的风险)替换培养基,将它们移至125ml摇瓶(96-120小时后)。

[0729] 核转染后10天,细胞准备好通过FACS分选。用LCA染色剂(与荧光素缀合的扁豆凝集素)对细胞进行染色。通过以 $\times 100g$ 离心8分钟制备用于FACS的细胞,用PBS洗涤细胞,再次以 $\times 100g$ 离心8分钟,并重新悬浮于预温热的CD CHO培养基中,加入 $20\mu g/ml$ LCA染色剂,放置45分钟,用 $\times 2$ PBS洗涤细胞(以 $\times 100g$ 离心8分钟,重新悬浮于PBS中)以去除任何未结合的染色剂。FUT8阳性细胞、FUT8阴性细胞(敲除细胞)的细胞表面上的LCA结合的岩藻糖未被染色,将其收集到预温热的CD CHO培养基中。将细胞置于 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 下进行回收并传代,直至细胞达到所需的细胞密度。

[0730] 无岩藻糖基化的HLA-G抗体的产生

[0731] 将HLA-G02抗体构建体在工程化的CHO-SXE细胞系中表达(Cain等人,2012),所述细胞系已被进一步修饰,使得 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)如上文所述被敲除。使用ExpiCHO转染系统(Thermo Fisher Scientific)从这些细胞中瞬时产生无岩藻糖基化的抗体。按照高产方案,将细胞以 6×10^6 个细胞/ml的细胞密度接种在ExpiCHO表达培养基中。对于200ml培养物,在加入细胞之前,将 $200\mu g$ DNA稀释到8ml Opti-PRO无血清培养基(SFM)中,并与含有 $640\mu l$ ExpiFectamine转染试剂的7.4ml Opti-PRO SFM混合。将细胞转移到设定为 $8\% CO_2$ 和 $37^\circ C$ 的培养箱(在设定为190RPM的摇动平台上)中,在转染后第1天,向细胞中加入48ml进料和 $1200\mu l$ 增强剂,并将其返回培养箱,将温度降至 $32^\circ C$ 。在第10天通过以4000RPM离心1小时收获培养物。通过细胞培养物上清液施加至 $0.22\mu m$ Stericup过滤器将其澄清。

[0732] 通过将 $100\mu l$ 上清液加载到连接至Infinity高效液相色谱(HPLC)系统的蛋白G柱上来测定产物滴定量。用 $150mM$ 氯化钠($pH 2.1$)将产物从柱上洗脱下来,并将 A_{280} 信号与纯化的Fab标准品进行比较。将澄清的上清液以 $5ml/min$ 的速度加载到MabSelect Sure柱(GE Healthcare)上,并用3倍柱体积(CV)的PBS $pH 7.4$ 洗涤。用低 pH 缓冲液($pH 3.6$ 的 $0.1M$ 柠檬酸钠缓冲液)将捕获的蛋白质从柱上洗脱下来。用 $2M$ Tris-HCl $pH 8.5$ 中和洗脱液。为了去除高分子量种类,将亲和纯化的蛋白质以 $1ml/min$ 加载到在 $10mM$ 磷酸盐缓冲盐水($pH 7.4$)中平衡的Superdex 16/60凝胶过滤色谱柱上,并在合并合适的级分之前通过SE-UPLC分析对洗脱级分进行分析。将合并的级分进行SDS-PAGE和SE-UPLC以测定蛋白质质量和纯度。

[0733] 在本公开中,除非另有说明,否则“HLA-G02”是指未经修饰的常规(即岩藻糖基化的)VR12389gL2gH16 IgG1。“无岩藻糖基化的HLA-02”是指根据本文所述方法产生的相应的无岩藻糖基化的IgG1抗体。

[0734] 实施例7:HLA-G抗体的结合、亲和力和特异性

[0735] 7.1.通过SPR测量的对HLA-G WT的亲和力

[0736] 使用Biacore T200(GE health care Biosciences AB)通过表面等离子体共振测定抗HLA-G抗体(hIgG1形式)对HLA-G的结合亲和力。测定在 $25^\circ C$ 下进行。将Fc特异性的Affinipure F(AB')₂片段山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)通过胺偶联化学固定在Series S CM5传感器芯片(GE Healthcare Bio-Sciences AB)上,达到约6000个反应单位(RU)的水平。HBS-EP⁺缓冲液($10mM$ HEPES $pH 7.4$, $0.15M$ NaCl, $3mM$ EDTA, 0.05% 表面活性剂P20,GE Healthcare Bio-Sciences AB)用作运行缓冲液,流速为 $10\mu l/min$ 。通过活化和

灭活适当的流动池来制备参考表面。

[0737] 注射10 μ L浓度为0.6-0.9 μ g/mL的抗HLA-G抗体用于被固定的抗人IgG Fc捕获。在各种最高浓度4000nM、400nM、100nM和50nM的所捕获的抗HLA-G hIgG1上,以30 μ L/min的流速滴定人HLA-G ECD+B2m,持续60s、90s或120s,随后解离120s、180s或240s(表8)。

[0738] 表8:

捕获	样品	浓度 (nM)	接触	解离
常规 HLA-G02 和无岩藻糖基化的	HLA-G	50	90	180
HLA-G02 两者				
HLA-G01, HLA-G03, HLA-G05	HLA-G	100	90	180
HLA-G04	HLA-G	400	120	240
HLA-G06, HLA-G07, HLA-G08	HLA-G	4000	60	120

[0741] 结果如表9所示。

[0742] 表9:如通过SPR测定的HLA-G抗体的亲和力

抗体 ID	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM)
HLA-G01	5.85E+05	3.35E-03	5.72
HLA-G02 (VR12389gL2gH16)	6.18E+05	3.15E-03	5.09
HLA-G06	3.09E+05	7.91E-02	256
HLA-G03	4.04E+05	2.34E-04	0.58
HLA-G07	4.39E+05	2.00E-01	456
HLA-G04	5.61E+04	4.33E-04	7.72
HLA-G05	2.00E+05	1.40E-03	6.98
HLA-G08	2.19E+05	7.66E-02	349

[0744] 如通过SPR所测定的,HLA-G06、HLA-G07和HLA-G08对HLA-G的亲和力最低(较高的KD值)。HLA-G01、HLA-G02、HLA-G03对HLA-G的亲和力最高。

[0745] 在另一个测定中,还评估了无岩藻糖基化的HLA-G02的亲和力,发现其与常规(岩藻糖基化的)HLA-G02对应物相似。结果如下表10所示。

[0746] 表10:SPR对传统和无岩藻糖基化的HLA-G02抗体的亲和力

抗体 ID	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM)
[0747] HLA-G02 (常规的, 即岩藻糖基化的)	8.24E+05	3.54E-03	4.30
无岩藻糖基化的 HLA-G02	8.07E+05	3.55E-03	4.40

[0748] 7.2.通过SPR测量对HLA-G Nu11 1,2,3的亲合力以评估特异性

[0749] 使用Biacore T200 (GE Healthcare Biosciences AB) 通过表面等离子体共振测定抗HLA-G IgG1抗体对HLA-G Nu11 1,2,3的结合亲和力。测定在25℃下进行。将Fc特异性的Affinipure F (AB')₂片段山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在Series S CM5传感器芯片 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 上,达到约6000个反应单位(RU)的水平。HBS-EP⁺缓冲液 (10mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05%表面活性剂P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) 用作运行缓冲液,流速为10μL/min。通过活化和灭活适当的流动池来制备参考表面。

[0750] 注射10μL浓度为0.6-0.9μg/mL的抗HLA-G抗体用于被固定的抗人IgG Fc捕获。以30μL/min的流速在20μM的捕获的抗HLA-G IgG上滴定人“HLA-G Nu11 1,2,3”突变体AVI tev 10HisTag+B2m,持续60s,随后解离150s。通过注射10μL的40mM HCl,随后注射5μL的5mM NaOH,以10μL/min的流速再生表面。

[0751] 使用Biacore T200评估软件 (3.0版) 利用稳态分析来分析背景扣除结合曲线。结果如表11所示。

[0752] 表11:通过SPR测定的对HLA-G Nu11 1,2,3的亲合力

抗体 ID	KD (μM)
HLA-G01	无结合
HLA-G02 (常规的, 即岩藻糖基化的)	无结合
[0753] 无岩藻糖基化的 HLA-G02	无结合
HLA-G06	无结合
HLA-G03	无结合
HLA-G07	无结合
HLA-G04	无结合
[0754] HLA-G05	无结合
HLA-G08	7.8

[0755] 对于HLA-G01-HLA-G07,未检测到结合。HLA-G08显示出一定的与HLA-G Nu11 1,2,3的结合,因此对HLA-G的特异性较低。

[0756] 7.3. 与HEK表达的HLA-G野生型对比HLA-G Nu11 1,2,3的结合以评估抗体的特异性

[0757] 测量与人胚胎肾 (HEK293) 细胞上表达的HLA-G野生型的结合,并将其与“HLA-G Nu11 1,2,3”进行比较以确定结合特异性。有利的是,使用基于细胞的测定,可评估与二聚体HLA-G的结合,而上述SPR测定仅测量与单体HLA-G的结合

[0758] 将用HLA-G/ β 2m或HLA-G Nu11 1,2,3/ β 2m转染的HEK293细胞与抗HLA-G IgG1在384孔V形底板 (Greiner) 中于4℃孵育2小时。IgG浓度范围为100nM至0.05nM-稀释在PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中。孵育期后,将细胞在测定缓冲液中洗涤三次,然后与20 μ L染色溶液在4℃孵育20min (R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) -3.75 μ g/ml和存活力染料e780 (Life Technologies))。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液 (Sigma-Aldrich) 中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定PE阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算EC50和Emax。结果如表12所示。

[0759] 表12:通过FACS测定对HEK表达的HLA-G和HLA-G Nu11,2,3的亲合力

抗体 ID	HEK 细胞上的结合			
	HLA-G WT EC50 (nM)	HLA-G WT Emax (MFI)	HLA-G null 1,2,3 EC50 (nM)	HLA-G null 1,2,3 Emax (MFI)
[0760]				
			(nM)	(MFI)
	HLA-G01	1.54	129298	ND
	HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	1.65	141300	ND
	无岩藻糖基化的 HLA-02	0.92	89198	ND
[0761]	HLA-G06	1.26	115689	ND
	HLA-G03	2.02	189443	ND
	HLA-G07	1.03	104296	ND
	HLA-G04	2.73	178887	ND
	HLA-G05	2.96	165437	ND
	HLA-G08	1.57	137718	35.90
				2858

[0762] 与HLA-G01和HLA-G02相比,HLA-G03对HEK293上表达的HLA-G的亲合力最低。因此,HLA-G01和HLA-G02优于HLA-G03。无岩藻糖基化的HLA-G02对HEK表达的HLA-G的亲合力与其常规(岩藻糖基化的)对应物相似。检测到HLA-G08与HLA-G Nu11 1,2,3的结合,这证实了该抗体的特异性较低。

[0763] 7.4通过FACS测定确定与JEG3细胞的结合亲和力

[0764] 使用天然表达HLA-G的人绒毛膜滋养层细胞 (JEG3) 在基于细胞的流式细胞术测定中测量抗HLA-G IgG的结合亲和力。该测定可以有利地用于测量与天然表达HLA-G的细胞的结合,包括与细胞上二聚体HLA-G的结合,而上述SPR测定仅测量与单体HLA-G的结合。

[0765] 将JEG3细胞与1.5ml抗HLA-G IgG1溶液在微量离心管 (Eppendorf) 中于4℃孵育两小时。IgG浓度范围为10nM至0.0005nM-稀释在PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中。将细胞转移到384孔V形底板 (Greiner) 中,并在测定缓冲液中洗涤三次,在4℃与20μl染色溶液一起孵育20分钟 (R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG (H+L) (Jackson immunoresearch) -7.5μg/ml和存活力染料e780 (Life Technologies))。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液 (Sigma-Aldrich) 中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在20μl PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定PE阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算KD。结果如表13所示。

[0766] 表13:如通过FACS测定的对JEG3细胞的亲和力

抗体 ID	FACS 亲和力
	KD (nM)
HLA-G01	0.045
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	0.020
[0767] HLA-G06	-
HLA-G03	0.068
HLA-G07	-
HLA-G04	-
HLA-G05	0.174
HLA-G08	-

[0768] HLA-G01和HLA-G02在FACS测定中显示出较高的亲和力。结果证实,与HLA-G01和HLA-G02相比,当在天然表达HLA-G的细胞表面表达,特别是作为二聚体表达时,HLA-G03对HLA-G的亲和力较低。

[0769] 7.5. 与HLA-I和JEG3野生型 (WT)/HLA-G敲低的结合

[0770] 测量与HEK293细胞上表达的HLA-A/B/C/E/F共有分子的结合,以进一步探索抗HLA-G IgG结合的特异性。在同一测定中,还测量了与JEG3细胞上表达的HLA-G的结合,并将其与JEG3 HLA-G敲低 (KD) 进行了比较。

[0771] 将用HLA-A、B、C、E或F共有序列/β2m和JEG3 WT以及JEG3KD转染的HEK293细胞与抗HLA-G IgG1在384孔V形底板 (Greiner) 中于4℃孵育2小时。IgG浓度范围为100nM至0.05nM-稀释在PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中。孵育期后,将细胞在测定缓冲液中洗涤三次,然后

与20 μ l染色溶液在4 $^{\circ}$ C孵育20min(R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch)-3.75 μ g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定PE阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算EC50和Emax。结果如表14和表15所示。

[0772] 表14:与HLA-A/B/C/E/F的结合

	HLA-A 结 合 EC50 (nM)	HLA-A 结 合 Emax (MFI)	HLA-B 结 合 EC50 (nM)	HLA-B 结 合 Emax (MFI)	HLA-C 结 合 EC50 (nM)	HLA-C 结 合 Emax (MFI)
抗体 ID						
HLA-G01	ND	373.3	ND	221.6	ND	119
HLA-G02	ND	57.3	ND	142.6	ND	65
[0773] 无岩藻糖 基化的 HLA-G02	ND	191	ND	91	ND	117
	HLA-E 结 合 EC50 (nM)	HLA-E 结 合 Emax (MFI)	HLA-F 结 合 EC50 (nM)	HLA-F Emax (MFI)		
抗体 ID						
HLA-G01	ND	120.5	ND	54	-	-
	HLA-G02	ND	45	ND	67.6	-
[0774] 无岩藻糖 基化的 HLA-G02	ND	54	ND	73		

[0775] 未检测到与HLA-I共有序列的结合(“ND”)。结果证实,HLA-G01和HLA-G02抗体对HLA-G具有高度特异性。

[0776] 表15:与JEG3WT的结合

[0777]

抗体 ID	JEG3 WT 结合 EC50 (nM)	JEG3 WT 结合 Emax (MFI)
HLA-G01	0.38	58094
HLA-G02	0.43	63979
无岩藻糖基化的 HLA-G02	0.2	44416
HLA-G06	4.10	6966
HLA-G03	0.41	38189
HLA-G07	3.42	4900
HLA-G04	3.65	31373
HLA-G05	1.26	44413

[0778] 此外,未检测到与JEG3 KD的结合。与HLA-G01和HLA-G02(或无岩藻糖基化的HLA-G02)相比,HLA-G03具有相似的EC50,但Emax低得多,因此不如HLA-G01或HLA-G02好。

[0779] 7.6.HLA-G上的抗HLA-G抗体的结合结构域的测定

[0780] 测量与人胚胎肾(HEK293)细胞上表达的HLA-G Nu113、HLA-G Nu111,3和HLA-G Nu113 2AA的结合,以表征抗HLA-G IgG的结合结构域。

[0781] 将用HLA-G Nu113/ β 2m、HLA-G Nu111,3/ β 2M和HLA-G Nu113 2AA/ β 2M转染的HEK293细胞与抗HLA-G IgG1在384孔V形底板(Greiner)中于4℃孵育2小时。IgG浓度范围为100nM至0.05nM-稀释在PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中。孵育期后,将细胞在测定缓冲液中洗涤三次,然后与20 μ l染色溶液在4℃孵育20min(R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch)-3.75 μ g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定PE阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算EC50和Emax。结果如表16所示。

[0782] 表16:与HEK293上表达的HLA-G Nu113、HLA-G Nu11 1,3和HLA-G Nu113 2AA的结合

抗体 ID	HLA-G Null3 EC50 (nM)	HLA-G Null3 Emax (MFI)	HLA-G Null 1,3 EC50 (nM)	HLA-G Null 1,3 Emax (MFI)	HLA-G Null3 2AA EC50 (nM)	HLA-G Null3 2AA Emax (MFI)
[0783] HLA-G01	ND	214	ND	182	ND	281
HLA-G02	ND	97	ND	87	ND	44
HLA-G06	ND	348	ND	318	ND	281
HLA-G03	ND	166	ND	247	ND	186
HLA-G07	0.09	124	ND	206	ND	97
HLA-G04	ND	204	ND	278	ND	317
HLA-G05	ND	17	ND	111	ND	178
HLA-G08	13.38	4893	17.02	11716	15.50	2318

[0784] 数据显示,包括HLA-G02在内的抗体对HLA-G α 3结构域具有特异性。数据证实HLA-G08的特异性最低。

[0785] 7.7. 在PBMC-实验中评估HLA-G02的特异性

[0786] 使用来自50个不同供体的PBMC进一步证实了HLA-G02的特异性,所述供体代表了多种HLA-I等位基因。目的是确认抗HLA-G抗体是特异性的,并且不与PBMC,特别是CD4⁺ T淋巴细胞上表达的其它HLA-I分子发生交叉反应。

[0787] 从外周静脉血中纯化PBMC,并将其在冷冻培养基(90% FBS+10% DMSO)中储存于液氮中。将来自50名不同供体的PBMC解冻并重悬于1ml完全RPMI培养基(RPMI 1640培养基+10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素)中。将细胞以300rpm离心10min,并用PBS洗涤两次。将细胞沉淀重悬于1ml Facs缓冲液(PBS,0.5% BSA和2mM EDTA)中,并将细胞以50 μ l细胞悬浮液/孔接种于96孔板中。

[0788] 细胞用抗人CD4-APC(Biolegend,2.5 μ l/孔)和抗HLA-G抗体(HLA-G02或对照“pan-HLA”,一种与HLA-I结合但不特异于HLA-G的IgG1)或同种型对照(50 μ l浓度为20 μ g/ml的溶液/孔)染色。将细胞在室温下于黑暗中孵育20min,然后用Facs缓冲液洗涤两次,并重悬于50 μ l含有二抗山羊抗人IgG-FITC(Jackson ImmunoResearch,稀释度1/100)的Facs缓冲液中。将细胞在室温下于黑暗中再孵育20min,然后用Facs缓冲液洗涤两次。将细胞重悬于100 μ l/孔的Facs缓冲液中,并在Canto II (HTS1)上采集样品,每个样品收集10,000个事件。使用FlowJo软件v10.6.0通过测量每个供体的每个CD4⁺细胞群的平均荧光强度(MFI)进行分析。使用Graphpad Prism软件绘制图表。

[0789] 结果如图4所示。图4显示了与pan-HLA抗体相比,特异性抗HLA-G抗体HLA-G02在50个不同供体中缺乏与CD4⁺ T细胞的结合。数据以每个供体的平均荧光强度(MFI)表示。

[0790] 7.8. HLA-G02与细胞膜结合的HLA-G同种型:HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3或HLA-G4的结合

[0791] 使用ExpiFectamine™293转染试剂盒并按照制造商的方案(ThermoFisher Scientific, ref#A14524),用编码HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3或HLA-G4的质粒转染Expi293F人细胞。转染后24小时,收获细胞,在PBS中洗涤(300rpm, 10min)并重悬于PBS中。将细胞接种在96孔/板上,用终浓度为10 μ g/ml的抗HLA-G抗体HLA-G02(人IgG1)或商购可得的抗体4H84(Abcam, Mouse IgG1)染色,并在黑暗中孵育220min。然后用Facs缓冲液(PBS, 0.5% BSA和2mM EDTA)洗涤细胞两次,并重悬于50 μ l含有二抗山羊抗人IgG-PE(Jackson ImmunoResearch, 稀释度为1/100)或山羊抗小鼠IgG-PE(Jackson ImmunoResearch, 稀释度为1/100)的Facs缓冲液中。将细胞在室温下于黑暗中再孵育20min,然后用Facs缓冲液洗涤两次。将细胞重悬于100 μ l Facs缓冲液中,并在Canto II(HTS1)上采集样品。

[0792] 结果如图5所示。图5A显示,与阴性对照(neg CTRL, 无关Ab)相比,特异于HLA-G α 3结构域的HLA-G02抗体识别HLA-G1和HLA-G2(阳性细胞分别为68%和17%),但不识别HLA-G3和HLA-G4。特异于 α 1结构域的商业小鼠抗HLA-G抗体4H84被用作阳性对照,并识别所有的同种型HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3或HLA-G4(分别对81、34、67和16%的细胞染色)。

[0793] 图5B更特别地显示了与阴性对照(无关Ab)相比,特异于HLA-G α 3结构域的HLA-G02抗体识别HLA-G2(17%的阳性细胞)。特异于 α 1结构域的商业小鼠抗HLA-G抗体4H84被用作HLA-G2的阳性对照(34%的阳性细胞)。

[0794] 实施例8:HLA-G抗体阻断HLA-G与ILT2或ILT4之间相互作用的能力的评估

[0795] 8.1. JEG3与ILT2的相互作用的阻断

[0796] 将抗HLA-G IgG与表达HLA-G的人绒毛膜癌滋养层(JEG3)和ILT2兔Fc一起孵育,以测量其阻断ILT2与HLA-G结合的效力。

[0797] 将JEG3细胞与抗HLA-G IgG1在384孔V形底板(Greiner)中于4 $^{\circ}$ C孵育1小时。IgG浓度范围为100nM至0.05nM-稀释在PBS、1%FBS和0.1%叠氮化钠中。孵育期后,在检测缓冲液中洗涤细胞,然后与20 μ l浓度为3 μ g/ml的ILT2rbFc溶液在4 $^{\circ}$ C一起孵育1小时。孵育后,将5 μ l染色溶液(Fc片段特异性荧光素(FITC)AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗兔IgG(Jackson ImmunoResearch)-7.5 μ g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))加入每个孔中,在4 $^{\circ}$ C下进行20min。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定FITC阳性细胞的百分比。使用FACSDiva分析软件根据中值荧光强度计算IC50和抑制百分比。结果如表17所示。

[0798] JEG3与ILT2之间的相互作用的阻断:大体积反应

[0799] 一些抗体在之前的ILT2阻断测定中显示出非常低的IC50。在这些低浓度下,配体耗竭最有可能发生,因为反应体积小,可能导致高估IC50值。为了克服配体耗竭,将大体积抗HLA-G IgG溶液(在之前的测定中鉴定出的最佳阻断抗体的)与表达HLA-G的JEG3和ILT2兔Fc一起孵育,以改善对其阻断ILT2与HLA-G结合的效力的测量。

[0800] 将JEG3细胞与1.5ml抗HLA-G IgG1溶液在微量离心管(Eppendorf)中于4 $^{\circ}$ C孵育两小时。IgG浓度范围为10nM至0.005nM-于PBS、1%FBS和0.1%叠氮化钠中稀释的。将细胞转移到384孔V形底板(Greiner)中,并在测定缓冲液中洗涤三次,然后与20 μ l浓度为3 μ g/ml的ILT2rbFc溶液在4 $^{\circ}$ C下一起孵育1小时。孵育期后,洗涤细胞并与20 μ l染色溶液(Fc片段特异性荧光素(FITC)AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗兔IgG(Jacksonimmuno research)-7.5 μ

g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))在4℃一起孵育20min。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在20 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定FITC阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算IC50和抑制百分比。结果如表17所示。

[0801] 8.2.HEK上表达的HLA-G与ILT2之间的相互作用的阻断

[0802] 将抗HLA-G IgG与用HLA-G和ILT2兔Fc转染的HEK293细胞一起孵育,以测量其阻断ILT2与HLA-G结合的效力。

[0803] 将用HLA-G/ β 2M转染的HEK293细胞与抗HLA-G IgG1在384孔V形底板(Greiner)中于4℃下一起孵育1小时。IgG1浓度范围为100nM至0.05nM-于PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中稀释的。孵育期后,在测定缓冲液中洗涤细胞,然后与20 μ l浓度为1 μ g/ml的ILT2rbFc溶液在4℃一起孵育1小时。孵育后,将5 μ l染色溶液(Fc片段特异性荧光素(FITC)AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗兔IgG(Jackson immunoresearch)-3 μ g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))加入每个孔中,在4℃下进行20min。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定FITC阳性细胞的百分比。使用FACSDiva分析软件根据中值荧光强度计算IC50和抑制百分比。结果如表17所示。

[0804] 8.3.HCT116上表达的HLA-G与ILT4之间的相互作用的阻断将抗HLA-G IgG与用HLA-G和ILT4兔Fc转染的人结肠癌(HCT116)细胞一起孵育,以测量其阻断ILT4与HLA-G结合的效力

[0805] 将用HLA-G/ β 2M转染的HCT116细胞与抗HLA-G IgG在384孔V形底板(Greiner)中于4℃一起孵育1小时。IgG1浓度范围为100nM至0.05nM-稀释于PBS、1% FBS和0.1%叠氮化钠中。孵育期后,在测定缓冲液中洗涤细胞,然后与20 μ l浓度为1 μ g/ml的ILT4rbFc溶液在4℃孵育0.4小时。孵育后,将5 μ l染色溶液(Fc片段特异性荧光素(FITC)AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗兔IgG(Jackson immunoresearch)-1.5 μ g/ml和存活力染料e780(Life Technologies))加入每个孔中,在℃下进行20min。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在40 μ l PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定FITC阳性细胞的百分比。使用FACSDiva分析软件根据中值荧光强度计算IC50和抑制百分比。结果如表17所示。

[0806] 表17:HLA-G抗体的阻断活性(IC50值)

抗体 ID	ILT2rbFc	ILT2rbFc	ILT2rbFc	ILT4rbFc
	JEG3 流动平均 IC50 (nM)	大体积 JEG3 平均 IC50 (nM)	HEK-HLAG 平均 IC50 (nM)	HCT116-HLAG 平均 IC50 (nM)
HLA-G01	0.59	0.039	1.58	1.78
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	0.53	0.017	1.37	1.31
无岩藻糖基化的 HLA-G02	0.51	0.021	0.83	1.38
HLA-G06	7.40	-	10.54	4.58
HLA-G03	0.47	0.038	1.59	1.86
HLA-G07	1.82	-	2.33	2.82
HLA-G04	1.10	-	2.05	3.32
HLA-G05	0.74	-	1.51	2.59
HLA-G08	1.58	-	9.84	2.75

[0807] HLA-G01和HLA-G02被确定为HLA-G与ILT2的缔合以及HLA-G与ILT4的缔合的最佳阻断剂。无岩藻糖基化的HLA-G02的阻断特性与其常规(即岩藻糖基化的)对应物的特性相似。

[0808] 实施例9:HLA-G01-HLA-G08抗体在表达HLA-G的细胞的ADCC中的功效和效力

[0809] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是表达Fc受体的细胞诸如NK细胞可籍以识别并杀死抗体包被的细胞的免疫机制。这是抗癌反应的关键过程,也是许多抗癌疗法的功效的潜在关键机制。使用两种不同类型的表达HLA-G的靶细胞测定了一小组抗HLA-G IgG1抗体在体外引发ADCC的能力。这些细胞或者用HLA-G和人 β -2-微球蛋白转染(HCT116结直肠癌细胞),或者在其细胞表面上内源性表达靶标(JEG3细胞)。

[0810] 方法:

[0811] HCT116结直肠癌细胞系的转染

[0812] 用也编码绿色荧光蛋白(GFP)标签的HLA-G构建体转染HCT116细胞。因此,用HLA-G

成功转染的细胞也表达GFP,并且可通过流式细胞术容易地鉴定和准确地监测。将总共40 μ g DNA (HLA-G ECD GFP和人 β 2M质粒各20 μ g)和80 μ L lipofectamine LTX用于转染T75组织培养瓶中的4x10⁶个HCT116细胞。24小时后,如下所述,将细胞从烧瓶中分离出来并用作靶细胞。

[0814] 体外ADCC测定

[0815] 将HLA-G转染的HCT116或JEG3靶细胞铺板(2x10⁴个细胞/孔,于50 μ L的体积中)到聚丙烯圆底板中的合适培养基中。将抗HLA-G或对照抗体在相同培养基中制备成4X浓缩原液,并将50 μ l/孔加入到适当的孔中。根据可用供体NK细胞的数量,以一式两份或一式三份对所有抗体进行测试。一些靶细胞不使用任何抗体,用作无处理对照。

[0816] 使用磁珠试剂盒(Miltenyi Biotech)通过阴性选择从全血中分离原代人NK细胞。将纯化的NK细胞以测定所需的最小体积重悬于RPMI+10% FBS,2mM L-谷氨酰胺中。向测定板的适当孔中,在靶细胞和抗体的顶部加入100 μ l/孔NK细胞。效应子:根据供体NK细胞数量,靶标比率介于10:1与3:1之间。

[0817] 将测定板在37 $^{\circ}$ C 5% CO₂下孵育约3小时。3小时后,通过流式细胞仪测量活靶细胞的数量。将测定板以300g离心3分钟以沉淀细胞,并对每个孔的上皮细胞标记Epcam和NK细胞标记CD56进行染色。将染色抗体(抗Epcam PE和抗CD56 BV421)在细胞染色缓冲液中稀释至1/100,并向每个孔中加入100 μ L/孔。将该板在室温下孵育15分钟。染色后,用150 μ l/孔PBS洗涤细胞两次,并在每次洗涤之间以300g离心平板3分钟。在染色结束时,将每个孔中的细胞重悬于最终体积为100 μ L/孔的含有50nM TO-PROTM-3细胞活力染料的PBS中。

[0818] 10分钟后,在BD FACS Canto II仪上从每个孔中准确采集70 μ L样品,并使用FlowJoV10.60软件分析数据。确定每个孔的活靶细胞总数。活靶细胞首先被鉴定为TO-PROTM-3阴性,然后被鉴定为CD56阴性和SSC高。然后根据Epcam (JEG3) 或Epcam和GFP表达(HCT116)对细胞进行门控。计算每个测试样品相对于未处理细胞或同种型对照的耗竭百分比,并将数据转移到GraphPad Prism 8.1.1软件进行分析。

[0819] 结果:

[0820] 图6显示了用不同的抗HLA-G抗体或IgG1同种型对照抗体处理后的耗竭的Epcam+GFP+HCT116靶细胞的百分比。每种抗体以1 μ g(白条)或0.01 μ g/ml(条纹条)两种不同浓度进行测试。E:T比率为3.5:1。每个条代表三个数据点的平均值(和范围),每个点/正方形是单独的重复。数据来自一个代表性供体。

[0821] 表18列出了图6所示的每种抗体对Epcam+GFP+HCT116细胞的耗竭平均百分比(N.D.:未检测到)

[0822] 表18:EPC am+GFP+HCT 116细胞的平均耗竭百分比

[0823]

抗体	平均 GFP+细胞耗	平均 GFP+细胞耗竭
----	------------	-------------

ID	竭百分比(1 μ g/mL)	百分比 (0.01 μ g/mL)
HLA-G01	67.15	69.41
HLA-G02	73.11	70.51
HLA-G06	75.79	55.90
HLA-G03	75.01	61.45
HLA-G07	57.20	2.46
HLA-G04	66.48	43.83
HLA-G05	73.68	51.78
HLA-G08	71.20	39.00
IgG1 同种 型	0.93	N.D

[0825] 几种抗体在最高抗体浓度 (1 μ g/mL) 下显示出相似的平均GFP+细胞耗竭百分比。对于抗体HLA-G01和HLA-G02,观察到在最低浓度 (0.01 μ g/mL) 下观察到的最高平均GFP+细胞耗竭百分比。这些抗体将被用于在ADCC测定中进一步表征。

[0826] 图7显示了在用来自三个独立实验 (3个不同供体) 的抗HLA-G抗体HLA-G01和HLA-G02或IgG1同种型对照抗体处理后耗竭的Epcam+GFP+HCT116靶细胞的百分比。在1 μ g/ml (图7A) 或0.01 μ g/ml (图7B) 下测试抗体。E:T比率介于2.5:1与3:1之间。每个条代表单个实验数据的平均值 (和范围), 每个点、正方形或三角形是单独的重复。

[0827] 表19列出了图7A所示的每种抗体在1 μ g/mL下对Epcam+GFP+HCT116细胞的耗竭平均百分比。

[0828] 表19:Epcam+GFP+HCT116 (1 μ g/mL抗体) 的平均耗竭百分比

人 IgG1 抗体	平均耗竭百分比 实验 1	平均耗竭百分比 实验 2	平均耗竭百分比 实验 3
HLA-G01	81.61	70.21	67.15
HLA-G02	87.71	79.25	73.11
同种型	-34.56	-44.76	0.93

[0831] 表20列出了图7B所示的每种抗体在0.01 μ g/mL下对Epcam+GFP+HCT116细胞的平均耗竭百分比。

[0832] 表20:Epcam+GFP+HCT116 (0.01 μ g/mL抗体) 的平均耗竭百分比

	人 IgG1 抗体	平均耗竭百分比	平均耗竭百分比	平均耗竭百分比
		实验 1	实验 2	实验 3
[0833]	HLA-G01	83.83	70.79	69.41
	HLA-G02	85.09	75.92	69.42
	同种型	N.D	N.D	N.D

[0834] 在两种抗体浓度下,如在ADCC测定中所测定的,抗体HLA-G02比HLA-G01具有更好的细胞耗竭活性。

[0835] 图8显示了与同种型对照相比,用抗HLA-G抗体HLA-G01和HLA-G02滴定处理后Epcam+GFP+HCT116细胞的耗竭百分比。E:T比率为4:1。每个点代表3个重复的平均值(和范围)。显示的数据来自单个代表性供体。

[0836] 基于这些结果,选择HLA-G02抗体用于进一步的表征和开发,特别是如上所述制备了HLA-G02的无岩藻糖基化形式,用于与常规IgG1进行比较。

[0837] 抗体的无岩藻糖基化经显示增加Fc γ RIII:Fc结合亲和力,据报道可增加IgG1分子的ADCC潜能。因此,测试了HLA-G02的无岩藻糖基化形式引发转染的HCT116或JEG3细胞的ADCC的能力。将无岩藻糖基化抗体与以常规IgG1形式制备的相同抗体V区进行比较。

[0838] 图9A显示了用常规HLA-G02 IgG1(实线)或无岩藻糖基化的HLA-G02 IgG1(“aF HLA-G02”,虚线)处理后JEG3细胞的耗竭百分比。E:T比率为10:1。每个点代表2个重复的平均值(和范围)。数据来自单个代表性供体。

[0839] 图9B显示了用常规HLA-G02 IgG1(实线)或无岩藻糖基化的HLA-G02 IgG1(“aF HLA-G02”,虚线)处理后的Epcam+GFP+HCT116细胞的耗竭百分比。E:T比率为5:1。每个点代表3个重复的平均值(和范围)。数据来自单个代表性供体。

[0840] HLA-G02抗体在细胞杀伤测定中表现出更好的效力和功效,因此被选择用于进一步开发用于治疗的首选物。与其常规(即岩藻糖基化的)对应物相比,HLA-G02的无岩藻糖基化形式具有改善的ADCC。

[0841] 实施例10:HLA-G抗体HLA-G02在表达HLA-G的细胞的吞噬作用中的功效和效力

[0842] 将HLA阴性K562细胞用作靶标并经转染以表达HLA-G。将预标记的靶细胞(CTY+)与单核细胞来源的巨噬细胞(CD11b+)和呈hIgG1形式的HLA-G02抗体一起孵育。通过测量CTY+CD11b+细胞的百分比来分析吞噬作用

[0843] 方法:

[0844] 使用人Pan单核细胞分离试剂盒(Miltenyi)(一种用于分离未接触单核细胞的间接磁性标记系统),从外周静脉血中纯化CD14+单核细胞。在37°C、5% CO₂下于完全RPMI培养基(RPMI 1640培养基加10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素)中用50ng/ml重组MCSF将细胞分化成巨噬细胞,进行7天。

[0845] 使用4D-Nucleofector系统和SF细胞系4D-Nucleofector™ X试剂盒L(Lonza, ref#V4XC-2024)对HLA阴性红白血病K562细胞进行模拟转染或用HLA-G和B2m转染,并在37°C、5% CO₂下于完全RPMI中培养24小时。第二天,收获细胞,洗涤并用细胞痕量黄(Cell Trace Yellow)(Thermofisher)标记,再次洗涤并以每孔25,000个细胞的密度铺在96孔圆

底超低附着平板 (Corning Costar) 中的100 μ l完全RPMI中。随后将细胞与10 μ g/ml的抗CD47抗体或抗HLA-G抗体或同种型对照在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育1小时。洗涤后,将细胞与单核细胞来源的巨噬细胞(每孔50,000个巨噬细胞)以巨噬细胞:细胞靶标=2:1的比例混合。将混合后的细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育2小时。然后,在4 $^{\circ}$ C下将细胞洗涤并重悬于PBS加10%纯化的人Fc γ -结合抑制剂(Thermofisher)中20分钟,然后在4 $^{\circ}$ C下用抗CD11b-APC (Biolegend)染色20分钟。洗涤细胞,在DAPI (500ng/ml)存在的条件下,重悬于PBS加2mM EDTA加0.5% BSA中,排除死细胞。在BD FACSCanto上通过流式细胞术采集样品。使用FlowJo软件v10.6.0通过测量CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比进行分析。

[0846] 抗CD47用作阳性对照;研究表明,通过抑制靶细胞上的CD47,这导致抑制CD47与巨噬细胞上表达的SIRPa受体的相互作用,导致吞噬活性增加。CD47的表达经显示在肿瘤细胞上调,抗CD47抗体目前正在临床试验中进行测试。在吞噬测定中,评估单核细胞来源的巨噬细胞的吞噬活性是很好的对照,其表明模拟物和HLA-G转染的细胞都能够引发吞噬作用。

[0847] 结果:

[0848] 表21显示了与表达HLA-G的K562靶细胞 (HLA-G/B2m K562) 相比,抗HLA-G抗体对模拟物转染的K562的HLA-G特异性吞噬活性。数据以CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比表示,代表3个独立的实验(一式两份)。

[0849] 表21:抗HLA-G02的吞噬活性

IgG1 抗体	CTY+CD11b+细胞% (平均值)	
	模拟 K562	HLA-G/B2m K562
[0850] 同种型 CTL	26.8	24.6
抗 CD47	53.6	49.6
HLA-G02	25.6	39.6

[0851] 表22显示了与IgG1同种型对照相比的HLA-G02的统计上显著的HLA-G特异性吞噬活性。数据代表来自6个捐助者的合并数据(一式两份)。将数据导出到Excel并以模拟转染的细胞吞噬百分比的平均值作归一化。

[0852] 表22:抗HLA-G02的吞噬活性(6个供体)

[0853]

IgG1 抗体	相对于平均对照组的 CTY+CD11b+细胞百分比											
	模拟 K562						HLA-G/B2m K562					
	供体 A	供体 B	供体 C	供体 D	供体 E	供体 F	供体 A	供体 B	供体 C	供体 D	供体 E	供体 F
同种型												
CTL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	104.8	92.5	110.5	115.9	92.2	105.4
抗 CD47	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	99.4	109.8	88.6	86.5	71.6
HLA-G 02	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	123.6	109.8	215.9	256.1	202.4	184.8

[0854] 图10显示了与抗CD47抗体和同种型对照相比,人抗HLA-G IgG1抗体HLA-G02对模拟转染的K562靶细胞(图10A)和HLA-G/B2m转染的K562靶细胞(图10B)的HLA-G特异性吞噬活性的滴定。数据以CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比表示,代表2个供体中的1个(表23)。

[0855] 表23:HLA-G02的HLA-G特异性吞噬活性的滴定

[0856]

浓度 (µg/ml)	CTY+CD11b+细胞% (平均值)									
	模拟 K562					HLA-G/B2m K562				
	同种型 IgG1	HLA -G02	CTL 1	阴性 CT L2	阴性 aCD 47	同种型 IgG1	HLA-G 02	阴性 CT L1	阴性 CT L2	阴性 aCD 47
10	17.4	15.5	17.6	17.4	24.9	20.4	44.2	22.1	19.9	27.6
1	17.3	15.8	18.7	17.4	31.2	18.9	46.4	21.1	20.4	29.4
0.1	17.0	17.0	18.8	18.5	22.7	17.3	43.8	19.9	18.1	22.9
0.01	16.2	17.6	19.7	18.2	17.1	17.4	32.4	21.4	18.7	19.3
0.001	15.1	15.1	15.1	15.1	15.1	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4

[0857] 图11显示了与抗CD47抗体和同种型对照相比,HLA-G02的常规和无岩藻糖基化(aF)形式对模拟转染的K562靶细胞(图11A)和表达HLA-G的K562靶细胞(图11B)的HLA-G特异性吞噬活性的滴定。数据以CTY+CD11b+双阳性细胞的百分比表示,代表2个独立实验中3个供体中的1个(表24)。

[0858] 表24:HLA-G02和无岩糖基化的HLA-G02的HLA-G特异性吞噬活性的滴定

抗体 浓 度 ($\mu\text{g/ml}$)	CTY+CD11b+细胞% (平均值)							
	模拟 K562				HLA-G/B2m K562			
	同种型 HuIgG	HLA-G0	aF HLA-G0	aCD4	同种型 HuIgG	HLA-0	aF HLA-G0	aCD4
1	2	2	7	1	2	2	7	
10	17.0	24.3	26.6		22.5	43.3	48.0	
[0859] 1	18.6	21.5	24.1	43.1	22.8	43.0	47.8	45.5
0.1	17.6	20.6	21.0	33.0	22.2	43.7	45.3	37.6
0.01	18.3	19.3	18.9	23.8	23.7	36.2	36.0	26.5
0.001	18.5	25.3	25.1	20.6	21.4	28.8	30.9	25.2
0.0001	19.6	21.4	23.3		21.4	28.7	29.2	
0.00001	17.8	21.0	24.0		21.5	28.0	28.0	
0.000001	18.5	18.6	21.3		23.5	25.3	26.1	

[0860] 与常规(即岩藻糖基化的)对应物HLA-G02相比,无岩藻糖基化的HLA-G02显示出改善的ADCP。

[0861] 实施例11:VR12389抗体的X射线晶体学表位定位

[0862] HLA-G融合蛋白的蛋白质生产

[0863] ●肽B2mHLA-G C42S mut tev10his-HLA-G (C42S),其中同二聚化所需的半胱氨酸被突变为丝氨酸(以粗体标示的信号肽(表达后被切割),以下划线标示的肽,以斜体标示的GS接头,B2m序列,以斜体标示的GS接头,具有以灰色阴影标示的C42S的HLA-G序列,以粗体和斜体标示的 t e v 切割位点,以斜体标示的GS接头,10histag),

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCRIIPRHLQLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPK
 IQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSK
 DWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLTSQPKIVKWDRDMGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDS
 DSASPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQ
 [0864] SEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAA
 DTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPP
 KTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRP
 AGDGTFOKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQLEENLYFQ
GSGGSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 145)

[0865] 按照制造商的方案,使用Expi293TM表达系统(Life technologiesTM)通过瞬时转染来表达蛋白质肽BB2mHLA-G C42S mut tev10his.转染后5天收获细胞,将上清液立即用于纯化。将包含肽B2mHLA-G C42S mut tev10his蛋白的上清液施加到Histrap NiExcel柱上。

用pH 7.4的PBS、500mM NaCl、20mM咪唑洗涤未结合的蛋白质和污染物,并用pH 7.4的PBS、500mM NaCl、500mM咪唑洗脱肽B2mHLA-G C42S mut tev10his蛋白。合并含有纯化的肽B2mHLA-G C42S mut tev 10his蛋白的级分,通过将蛋白质与tev蛋白酶以1:100的比例在室温下孵育2小时并在4℃下孵育2小时来去除his标签。浓缩蛋白并已于用20mM Tris、50mM NaCl、pH 7.4缓冲液平衡的S200 26/60上通过尺寸排阻色谱进一步纯化。将含有纯化的肽B2mHLA-G C42S mut蛋白的级分合并,浓缩至2.94mg/ml,并以1mg等份于-80℃下贮存。

[0866] 通过SDS-PAGE表征肽B2mHLA-G C42S mut蛋白,并迁移到凝胶上与糖基化蛋白的预期分子量(MW)一致的位置。

[0867] 所获得的用于复合和晶体结构的蛋白质肽B2mHLA-G C42S mut的氨基酸序列如下:

[0868] RIIPRHLQLGCGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGE
RIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
SHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFSDSASPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMN
LQTLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVA
EQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVE
LVETRPAGDGTFFQKWAAVVVPSPGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQLEENLYFQ (SEQ ID NO:146)

[0869] ●Fab纯化12389

[0870] 将兔Fab (VR 12389) (由SEQ ID NO:9表示的轻链序列和由SEQ ID NO:13表示的重链序列) 在ExpiCHO细胞中作为分泌蛋白表达。以1:1的摩尔比共转化轻链和重链的表达构建体。通过将条件培养基通过蛋白G珠粒来纯化分泌的蛋白质,并用0.1M甘氨酸(pH 2.7)洗脱。通过加入pH8.5的2M Tris-HCl来中和级分。将蛋白质透析到pH 7.2的PBS中,然后浓缩至5.62mg/ml并于4℃下贮存。

[0871] ●具有VR12389 RbFab的肽B2mHLA-G C42S mut蛋白

[0872] 将融合的肽 β 2m_HLA-G与VR12389 RbFab以1:1.1的摩尔比孵育1小时。然后使用Superdex 200 16/600柱(GE Healthcare),使用10mM Tris-HCl、150mM NaCl (pH 7.5) 作为运行缓冲液来纯化该复合物。使用NuPAGE 4-20% Tris-甘氨酸(Thermo)通过SDS-PAGE来分析级分,然后使用Amicon® Ultra-15离心过滤单元(Millipore)将最纯的复杂级分浓缩至10.4mg/ml。

[0873] 具有VR12389 RbFab的晶体学肽B2mHLA-G C42S mut蛋白

[0874] 使用几种商购可得的结晶筛确定了复合物的结晶条件。这些使用Swissci 96-well 2-drop MRC结晶板(来源于Molecular Dimensions,目录号MD11-00-100)以坐滴形式进行。首先,使用Microlab STAR液体处理系统(Hamilton)在筛中用75 μ L的每种结晶条件填充储器。然后,使用蚊液处理器(Mosquito liquid handler) (TTP LabTech)将300nL HLA-G/VR 12389复合物和300nL池液(reservoir solution)分配到结晶板的孔中。在含有2M硫酸铵和pH 8.0的0.1M Tris的ProPlex-HT96筛(Molecular Dimensions)的条件G4下鉴定出晶体。使用含有25%甘油的池液作为冷冻保护剂冷冻晶体。在金刚石光源处收集衍射数据。在Phaser中使用分子置换解析了该结构。将Phenix.refine和Coot用于自动和手动精制的交替循环。

[0875] 通过将HLA-G与VR12389的复合物的晶体结构与HLA-G与ILT2和ILT4的复合物的晶体结构叠加(如文献中所报道的,参见例如Q Wang等人,Cellular&Molecular Immunology,

2019和Shiroishi,PNAS第103卷,第44期,P 16412-16417,2006),很明显VR12389通过空间位阻阻止HLA-G与ILT2和ILT4受体相互作用(图12)。

[0876] 在<4Å的接触距离下,VR12389抗体识别的HLA-G表位包含HLA-G残基V194、F195、Y197、E198、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250和Y257。

[0877] 在<5Å接触距离下,VR12389抗体识别的HLA-G表位包含HLA-G残基V194、F195、Y197、E198、R219、Q224、Q226、D227、V248、V249、P250、E253和Y257。

[0878] 实施例12:通过HDX-MS和NMR对12389抗体进行表位作图

[0879] 与在静态条件下进行的结晶学相比,HDX-MS和NMR是分析溶液中相互作用的技术,并允许显示通过晶体学测定并不总是明显的变构或构象变化。

[0880] HDX-MS材料和方法

[0881] 样品制备和数据采集

[0882] 对于HDX-MS分析,将12μM的人HLA-G ECD(SEQ ID NO:110)与36μM的12389抗体(表达为IgG1或Fab)复合并在4℃孵育1小时

[0883] 在25℃下,将4μL HLA-G或HLA-G复合物稀释到57μL 10mM的于H₂O中的磷酸盐(pH 7.0)中或稀释到10mM的于D₂O的磷酸盐(pD 7.0)中。然后将氘化样品在25℃下孵育0.5min、2min、15min和60min。反应后,通过在1℃下与淬灭缓冲液(4M盐酸胍、250mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)、100mM磷酸盐)以1:1混合淬灭所有样品。混合溶液的最终pH为2.5。将混合物立即注射到用于胃消化的nanoAcquity HDX模块(Waters Corp.)中。然后使用酶促在线消化柱(Waters)在0.2%甲酸水溶液中于20℃以100μL/min的流速在线进行肽消化。所有氘化时间点和未氘化对照均以一式三份进行,在每个数据点之间进行空白实验。

[0884] 然后使用Acquity BEH C18 1.7μM VANGUARD冷冻预柱捕集肽段,进行3分钟。然后使用以下梯度将肽洗脱到冷冻的Acquity UPLC BEH C18 1.7μM 1.0×100中:0min,5% B;6min,35% B;7min,40% B;8min,95% B,11min,5% B;12min,95% B;13min,5% B;14min,95% B;15min,5% B(A:0.2%的于H₂O中的HCOOH;B:0.2%的于乙腈中的HCOOH)。肽片段通过正电喷雾电离到Synapt G2-Si质谱仪(Waters)中。使用MSe法(低碰撞能量,4V;高碰撞能量:从18V上升至40V),在50-2000Th的m/z范围内以仅ToF模式运行数据采集。Glu-1-纤维蛋白肽B肽用于内部锁定质量校正(internal lock mass correction)。

[0885] HDX-MS数据处理

[0886] 使用Waters Protein Lynx Global Server 2.5.1(PLGS)将来自HLA-G的未氘化对照样品的MS^E数据用于序列鉴定。仅对HLA-G序列的数据库进行肽搜索,前体强度阈值为500个计数,分配需要3个匹配的产物离子。将3个对照样品的离子计数文件组合到导入Dynamx v3.0软件的肽列表中。

[0887] 肽在DynamX中经历进一步过滤。使用的过滤参数是最小和最大肽序列长度分别为4和25,最小强度为1000,最小MS/MS乘积为2,每个氨基酸的最小乘积为0.2,最大MH⁺误差阈值为10ppm。DynamX v3.0用于定量在每个时间点由每个肽的氘摄取产生的同位素包膜。此外,所有光谱都进行了检查和目视检查,以确保m/z峰的正确分配,并且只有信噪比高的肽段才用于HDX-MS分析。

[0888] 在Dynamx中进行手动过滤后,使用Deuterios进行统计分析和过滤,所述Deuterios使用Houde等人,2011发布的统计分析。Deuterios生成了woods图,其显示肽长度、起始和终

止残基、整体覆盖率以及为绝对摄取(以道尔顿为单位)的y轴度量。其是在配体(结合的)和载脂蛋白形式存在的情况下摄取的差异。Woods图首先对每个时间点的所有肽进行置信度过滤。差异氘化超出选定的置信限的肽不显著。

[0889] 结果:

[0890] 在VR12389存在的情况下,针对HLA-G观察到总共12种肽,其显示出抗体结合时氘掺入的统计上显著的减少,其中9种显示出主要保护作用。主要保护覆盖残基178-196 (MLQRADPPKTHVTHHPVFD)和214-230 (ILTWQRDGEDQTQDVEL)。两个区域都在 $\alpha 3$ 结构域内(和 $\alpha 2$ 的末端五个残基)。抗体结合后显示中等保护的覆盖残基234-249 (RPAGDGTFQKWA AVVV),并且可能归因于构象变化。在抗体存在和不存在的情况下显示相似交换模式的肽具有不显著的氘掺入。

[0891] 表25:显示VR12389与HLA-G结合后氘掺入减少的肽(如通过HDX-MS测定的)

开始	终止	肽序列	氘摄取
234	249	RPAGDGTFQKWA AVVV	中等保护
184	195	RADPPKTHVTHHPVF	中等保护
180	196	QRADPPKTHVTHHPVFD	中等保护
[0892] 181	195	RADPPKTHVTHHPVF	主要保护
217	229	WQRDGEDQTQDVE	主要保护
214	230	ILTWQRDGEDQTQDVEL	主要保护
178	196	MLQRADPPKTHVTHHPVFD	主要保护
216	229	TWQRDGEDQTQDVE	主要保护
180	195	QRADPPKTHVTHHPVF	主要保护
[0893] 178	195	MLQRADPPKTHVTHHPVF	主要保护
181	196	RADPPKTHVTHHPVFD	主要保护
216	227	TWQRDGEDQTQD	主要保护

[0894] 作为结论,从氘孵育30秒时的HDX-MS来看,VR12389的潜在结合结构域是178-MLQRADPPKTHVTHHPVFD-196和214-ILTWQRDGEDQTQDVEL-230。

[0895] 核磁共振(NMR)光谱学

[0896] 使用抗体的Fab片段,通过NMR光谱学测定抗体VR12389的表位作图。

[0897] 材料

[0898] $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的HLA-G $\alpha 3$ 结构域的表达

[0899] 通过标准热激用1 μg HLA-G $\alpha 3$ 短N-His ATUM#393044 (HLA-G残基:207-300)转化BL21 (DE3)感受态大肠杆菌(New England BioLabs#C2527H)。将转化的细胞铺在含有100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素的LB琼脂平板上,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天,用单菌落接种10ml含100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素(Merck#C1389)的LBroth,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以200RMP的速度振荡培养5小时(New

Brunswick Excella E25)。然后用1ml起始培养物接种500ml $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的基本培养基(如下所述)并在一次性使用的2L爱伦美氏烧瓶(VWR#734-1904)中于37°C下以200RPM摇动生长过夜。第二天记录过夜培养物的光密度(OD_{600}) (Amersham Biosciences Ultrospec 3100pro)。然后用过夜培养物接种表达培养物至0.1的最终 OD_{600} 。

[0900] 将 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的基本培养基表达培养物在一次性使用的2L爱伦美氏烧瓶中以500ml的批次在37°C下以200RMP振荡生长,直至 OD_{600} 达到0.9。然后用500 μM IPTG (Sigma# I6758) 诱导HLA-G α 3表达。然后将诱导的培养物在37°C下放置另外4小时,然后通过以7,000g离心30min来收获(Beckman Coulter J6-MI)。然后在细胞裂解前将收获的沉淀在-20°C下冷冻。

[0901] 人 β 2m的非标记表达

[0902] 用1 μg 人 β 2m(残基:21-119) ATUM#358573转化BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌,并将其如上生长。第二天,用单菌落接种10ml含有100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素的LBroth(10g/L胰蛋白胨、5g/L酵母提取物、5g/L NaCl, 1mM NaHO),并在37°C以200RMP的速度振荡培养5小时。然后用1ml起始培养物接种含有100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素的500ml LBroth,并在一次性使用的2L爱伦美氏烧瓶中在37°C下以200RPM的速度振荡培养过夜。第二天记录过夜培养物的 OD_{600} 。然后用过夜培养物接种表达培养物至0.1的最终 OD_{600} 。

[0903] 将2x TY(胰蛋白胨16g/L,酵母提取物10g/L,NaCl 5g/L)表达培养物再次在一次性使用的2L爱伦美氏烧瓶中以500ml的批次在37°C下以200RMP的速度摇动生长,直至 OD_{600} 达到3.0。然后培养箱温度降至17°C。30分钟后,用20x进料溶液(1M MOPS pH 7.2, 20mM MgCl_2 , 20mM MgSO_4 , 20%甘油)饲喂养培养物,并用150 μM IPTG诱导表达。然后将诱导的培养物在17°C下放置16小时,然后离心收集(7,000g,持续30min)。然后在细胞裂解前将收获的沉淀在-20°C下冷冻。

[0904] 细菌细胞溶解

[0905] 纯化和重折叠方案改造自:Craig S.Clements等人The production, purification and crystallization of a soluble heterodimeric form of a highly selected T-cell receptor in its unliganded and liganded state.Biological Crystallography,2002。

[0906] 在裂解缓冲液(50mM Tris pH 8.0、1% (v/v) Triton X-100、1% (w/v) 脱氧胆酸钠、100mM NaCl、10mM DTT、1mg DNA酶I (Biomedicals)、5mM MgCl_2 、完全蛋白酶抑制剂(Roche))中裂解细胞沉淀。在室温下连续搅拌10min后,加入10mM EDTA。然后使用20psi的压力在4°C下将重悬浮的细胞沉淀通过CF细胞破裂器(Constant systems)3次。然后通过4°C下以48,000g离心1小时来澄清裂解物(Beckman Coulter Avanti JXN-26)。然后用洗涤缓冲液1(50mM Tris pH 8.0、0.5% (v/v) Triton X-100、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.2mM完全蛋白酶抑制剂)洗洗不溶性沉淀2次。在每次洗涤之间,将重悬浮的包涵体以48,000xg离心30分钟。第二次洗涤后,将包涵体在最终洗涤缓冲液(50mM Tris pH 8.0、1mM EDTA、1mM DTT、完全蛋白酶抑制剂)中进行最后一次洗涤。然后将纯化的包涵体重新溶解在20mM Tris pH 8.0、8M尿素Sigma#U5378)、0.5mM EDTA、1mM DTT中。使用快速考马斯染色的NuPAGE 4-12%、Bis-Tris (Thermo#NP 0322)和NuPAGE MESSDS运行缓冲液(Thermo#NP0002)通过SDS-PAGE分析纯化级分。

[0907] $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HLA-G α 3和未标记的人 β 2m重折叠

[0908] 然后将再溶解的包涵体在重折叠前于1.5M盐酸胍、5mM乙酸钠、5mM EDTA中稀释至大约1mg/ml。

[0909] 首先将人 β 2m滴加到重折叠缓冲液:Tris pH 8.5,0.4M精氨酸,0.5mM氧化型谷胱甘肽,5mM还原型谷胱甘肽,2mM EDTA中。然后是摩尔比为1:1的 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的HLA-G α 3结构域。在温和搅拌下将重折叠反应在室温下放置16小时。然后使用3,000MWC0 Spectra/Por透析膜在透析缓冲液(5mM Tris pH 8.5)中以1:20的稀释倍数透析重折叠反应物。在室温下在24小时透析期间更换一次透析缓冲液。

[0910] 折叠复合物的纯化

[0911] 然后使用AKTA Pure(GE health care)系统和HiTrap Q柱(Cytiva Life Sciences)使用以下缓冲液和纯化顺序纯化重折叠的HLA-G α 3/ β 2m复合物:缓冲液A:10mM Tris,10mM NaCl pH 8.5缓冲液B:10mM Tris,500mM NaCl pH 8.5.纯化顺序:以5ml/min的速度运行,平衡:5CV缓冲液A,加载透析过的重折叠反应物,洗洗:10CV缓冲液A,洗脱:0-40% B(于10CV中),保持在40%(持续10CV),40-100% B(于20CV中),保持100% B(持续10CV)。

[0912] 使用NuPAGE 4-12%、Bis-Tris(Thermo)和NuPAGE MESSDS运行缓冲液(Thermo)通过SDS-PAGE分析级分,用快速考马斯染色剂(VWR#SERA35081.01)染色。在使用10,000MWC0 Amicon Ultra(Millipore)浓缩之前合并纯级分,并装载到S75 300/10增粘凝胶过滤柱(Cytiva Life Sciences)上,以150mM NaCl、10mM Tris pH7.4、0.02% NaN_3 作为运行缓冲液。再次通过SDS-PAGE分析级分,合并纯级分。在浓缩至约350 μm 之前,通过SDS-PAGE再次分析最终纯化的样品。使用Thermo Scientific Nanodrop 2000分光光度计测定蛋白质浓度。

[0913] Fab试剂的纯化:

[0914] 使用AKTA Pure系统(GE Healthcare)和填充的Gammabind Plus琼脂糖(Cytiva Life Sciences)柱纯化Fab试剂。在捕获前,使用AKTA Flux系统(GE Healthcare)将上清液浓缩至超过300mg/L。如下使用缓冲液和纯化顺序:缓冲液A:10mM PBS pH 7.4。缓冲液B:0.1M甘氨酸-HCl pH 2.7。平衡:5CV缓冲液A平衡。以一定流速加载上清液,以确保至少20分钟的接触时间。洗涤缓冲液A 5CV。洗脱:100%缓冲液B 5CV。用2M Tris pH 8.5中和洗脱级分。

[0915] 使用NuPAGE 4-20% Tris-甘氨酸和NuPAGE MOPSSDS运行缓冲液(用快速考马斯染色法染色)通过SDS-PAGE分析级分。在使用10,000MWC0 Amicon Ultra(Millipore)浓缩之前,合并纯级分,并加载到S200 26/60过滤柱(Cytiva Life Sciences)上,以10mM PBS pH7.4作为运行缓冲液。再次地,使用BEH200 SEC柱(Waters)通过SDS-PAGE和Acquity UPLC H-Class系统(Waters)分析级分。将纯级分合并,然后浓缩至超过5mg/ml。使用Thermo Scientific Nanodrop 2000分光光度计测定蛋白质浓度。

[0916] HLA-G α 3的骨架分配

[0917] 为了获得HLA-G α 3结构域的骨架分配,制备了500 μl 于150mM NaCl,10mM Tris pH 7.4,0.02% NaN_3 中的浓度为320 μM 的 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的HLA-G α 3与未标记的 β 2M的复合物样品,并将其转移至5mm NMR管中。在35 $^\circ\text{C}$ 下在配备低温冷却探头的600MHz Bruker AVIII-HD或600MHz Bruker AVANCE NEO光谱仪上记录所有实验。使用3D TROSY-HNCACB(Wittekind

和Mueller,1993HNCACB,a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha-and Beta-Carbon Resonances in Proteins.J.Magn.Reson.Ser.B 101,201-205.doi:10.1006/jmrb.1993.1033;Salzmann等人,1999.TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large Proteins.J.Am.Chem.Soc.121,844-848.doi:10.1021/ja9834226)和3D TROSY-HNCOCACB(Salzmann等人,1999,TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large Proteins.J.Am.Chem.Soc.121,844-848;Eletsky等人,2001.TROSY NMR with partially deuterated proteins.J.Biomol.NMR 120,177-180)进行蛋白质中残基的骨架NMR信号之间的顺序连接。用75、36和16ppm的谱宽和9(F1)、21(F2)和70(F3)ms的采集时间分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度上记录TROSY-HNCACB(每增量16次扫描,弛豫延迟1.3s,总采集时间5天)。用75、36和16ppm的谱宽和9(F1)、21(F2)和70(F3)ms的采集时间分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度上记录TROSY-HNCOCACB(每增量8次扫描,弛豫延迟1.3s,总采集时间2天17小时)。使用NMRPipe(Delaglio等人,1995NMRPipe:a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.J.Biomol.NMR 6,277-93)处理NMR谱。使用Sparky(Goddard和Kneller,D.G.SPARKY 3.In.,University of California,San Francisco)进行数据分析,导致80个残基的酰胺质子和氮残基的分配,对应于93%的天然蛋白质的残基(不包括脯氨酸残基)。

[0918] 绘制Fab片段的结合部位

[0919] 使用150μM的²H/¹³C/¹⁵N HLA-Gα3与含有10%摩尔过量的未标记Fabs的未标记的β2M的复合物样品进行Fab片段的结合位点的作图。在上述用于HLA-Gα3的骨架分配的相同缓冲液中制备200μl样品,并转移至3mm NMR管中。通过将在HLA-Gα3/β2M/Fab复合物上记录的TROSY(Pervushin等人,1998.Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer(ST2-PT)in[¹⁵N,¹H]-TROSY.J.biomol.NMR 12,345-348)光谱与HLA-Gα3/β2M的等效对照实验进行比较来测定¹H和¹⁵N化学位移变化。用36和16ppm的谱宽以及60(F1)和80(F2)ms的采集时间分别在¹⁵N和¹H维度上记录HLA-Gα3/β2M的对照TROSY实验(每增量8次扫描,弛豫延迟1.5s,总采集时间1小时)。用36和16ppm的谱宽以及60(F1)和80(F2)ms的采集时间分别在¹⁵N和¹H维度上记录HLA-Gα3/β2M/Fab的TROSY实验(每增量8次扫描,弛豫延迟1.5s,总采集时间1小时)。使用NMRPipe(Delaglio等人,1995NMRPipe:a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.J.Biomol.NMR 6,277-93)处理光谱。使用Sparky进行数据分析。

[0920] 使用最小位移方法(Williamson等人,1997,Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2by NMR chemical shift perturbation.Biochemistry 36,13882-9)分析化学位移变化,使用以下方程式计算组合化学位移变化(Δδ):

$$[0921] \quad \Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N\alpha_N)^2}$$

[0922] 其中Δδ_{HN}和Δδ_N分别是¹H和¹⁵N化学位移的差值。α_N对应于0.2的比例因子,用于说明氮化学位移的化学位移范围的差异。

[0923] 为了鉴定HLA-Gα3上的Fab结合部位,使用组合最小位移对蛋白质序列的直方图来

鉴定包含显著干扰的信号HLA-G α 3的区域。如果氨基酸的组合最小位移变化的大小超过所有氨基酸的组合化学位移变化平均值的阈值,则选择这些残基作为Fab结合部位中可能的接触残基进行进一步评估。

[0924] 应用两个阈值来鉴定被Fab结合的残基:其最小位移超过所有计算位移平均值的残基和其最小位移超过所有计算最小位移的平均值加一个标准偏差的残基。在这些分析中,脯氨酸残基无法鉴定,因为它们不含酰胺质子。

[0925] 结果:

[0926] 如通过NMR所确定的表位,如以渐增的严格性定义为超过所有计算位移(>0.0764)的平均值,包含残基T200、L201、L215、W217、R219、D220、E229、A245、A246、V247、V249、S251、E253、Q255、T258、H260、V261和W274。如通过NMR确定的表位,如以渐增的严格性定义为超过所有计算位移加一个标准偏差(>0.1597)的平均值,包含残基H191、Y197、E198、R202、L230、V248、G252、C259和K275。

[0927] 实施例13:通过液相色谱-质谱(LC-MS)表征抗体分子

[0928] 通过LC-MS,使用利用Xevo G2 Q-ToF质谱仪的Waters ACQUITY UPLC系统通过分离的重链和轻链(还原的)测量HLA-G02(VR12389gL2gH16)(未修饰的(岩藻糖基化的)和无岩藻糖基化的)、VR12389 gL2gH15和HLA-G01的分子量(MW)。将样品(~5 μ g)在37 $^{\circ}$ C下用5mM的于150mM乙酸铵中的三(2-羧乙基)膦(TCEP)还原40分钟。LC色谱柱为Waters BioResolveTMRP mAb聚苯,450 \AA , 2.7 μ m,保持在80 $^{\circ}$ C,用95%溶剂A(水/0.02%三氟乙酸(TFA)/0.08%甲酸)和5%溶剂B(95%乙腈/5%水/0.02%TFA/0.08%甲酸)以0.6mL/分钟的流速进行平衡。在8.8分钟内用5%至50%的溶剂B梯度洗脱蛋白质,然后用95%的溶剂B洗涤并重新平衡。在280nm处采集UV数据。质谱条件如下:离子模式:ESI正离子,分辨率模式(resolution mode),质量范围:4400-5000m/z和利用NaI的外部校准。

[0929] 使用Waters MassLynxTM和MaxEnt软件分析数据。

[0930] 如表26所示,来自所述序列的预测的MW与通过LC-MS对所有抗体的重链和轻链观察到的分子量一致。此外,对于VR12389gL2gH16,如预期的那样,对于相应的无岩藻糖基化的形式的重链存在~146Da的质量差异。

[0931] 表26:LC和HC分子量

抗体	轻链 MW (Da)			重链 MW (Da)		
	预期的	观察到的	Δm	预期的	观察到的	Δm
HLA-G01	23741.3	23741.4	0.1	49689.8	49691.8	2.0
VR12389 gL2gH15	23489.2	23489.0	-0.2	49771.8	49775.0	3.2
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	23489.1	23488.4	-0.7	49743.8	49744.0	0.2
无岩藻糖基化的 HLA-G02	23489.2	23487.0	-2.2	49597.7	49598.0	0.3

[0932] 实施例14:热稳定性 (T_m) 测量

[0934] 解链温度 (T_m) 或解折叠中点的温度使用热位移测定来确定,以评估分子的构象稳定性,从而评估制造的稳健性和长期稳定性。

[0935] 荧光染料**SYPRO®**橙用于通过结合疏水区来监测蛋白质解折叠过程,所述疏水区随着温度升高而暴露。反应混合物含有5 μ L 30x**SYPRO®**橙蛋白凝胶染色剂(ThermoFisher scientific, S6651),用测试缓冲液从5000x浓缩液稀释。将45 μ L的样品(0.2mg/mL,于PBS pH7.4中)加入染料中并混合。将10 μ L该溶液以一式四份分配到384PCR光学孔板中,并在QuantStudio 7实时PCR系统(ThermoFisher™)上运行。PCR系统加热装置设定为20°C,并以1.1°C/min的速度升至99°C。电荷耦合装置监测孔中的荧光变化。绘制荧光强度增加图,一个或多个斜率的拐点用于生成表观中点温度 (T_m)。数据如表27所示。

[0936] 表27:PBS pH 7.4中样品的热位移测定数据的概述。

抗体	CH2 结构域 ($^{\circ}$ C)	Fab 结构域 ($^{\circ}$ C)
HLA-G01	69.5 \pm0.2	86.8 \pm0.2
HLA-G02 (VR12389gL2gH16)	69.7 \pm0.1	85.4 \pm0.1
无岩藻糖基化的 HLA-G02	70.3 \pm0.2	84.2 \pm0.2
VR12389 gL2gH15	69.6 \pm0.1	83.9 \pm0.1

[0937] 样品表现出高且相似的热稳定性,表明移植物之间没有实质性的结构差异。Fab结构域的热稳定性可以有很大的变化(典型范围是70°C至84°C),高热稳定性是优选的,因为机械稳定性更高。正如预期的那样,在常规(即岩藻糖基化的)与无岩藻糖基化的HLA-G02之间未观察到有意义的结构差异。

[0938] 实施例15:实验等电点 (pI) 测量

[0940] iCE3™全毛细管成像毛细管等电聚焦 (cIEF) 系统(ProteinSimple™)用于通过实验确定pI。

[0941] 发现HLA-G01和HLA-G02主峰的实验pI相似。pI在预计对生产步骤和配制缓冲剂有利的范围内。少量酸性和碱性带电荷的种类的存在与其它IgG1治疗性分子一致,并可归因于常见的翻译后修饰。

[0942] 实施例16:使用聚乙二醇(PEG)聚集测定进行溶解度测量

[0943] PEG聚集测定被用作高浓度溶解度的模拟。PEG是非吸附性、非变性聚合物,由于其惰性性质,用于主要通过排阻体积效应来促进蛋白质沉淀。将样品暴露于浓度递增的PEG 3350;通过绘制280nm处的吸光度来确定溶液中剩余的样品量。一半样品沉淀时PEG浓度百分比的测定产生了PEG中点(PEG_{mdpnt})评分。该评分允许抗体分子根据表观天然状态聚集倾向性进行分级,低的PEG_{mdpnt}评分(例如≤10)表示天然状态聚集倾向性更大。

[0944] 在pH 7.4的PBS中和pH 5.0的缓冲液(普通的预制剂贮存缓冲液)中制备储备的40% PEG 3350溶液(w/v)。通过ASSIST PLUS液体处理机器人(INTEGRA™ 4505)进行系列滴定,得到在40%至15.4%范围内的PEG 3350。为了最大限度地减少非平衡沉淀,样品制备由以1:1的体积比混合抗体和PEG溶液组成。通过液体处理机器人将35μL PEG 3350储备溶液加入96孔v形底PCR板(A1至H1)。向PEG储备溶液中加入35μL 2mg/mL的样品溶液,得到1mg/mL的测试浓度和20%至7.7%的PEG 3350终浓度。通过自动缓慢重复移液混合该溶液,并在37°C下孵育0.5小时,以重新溶解任何非平衡聚集体。然后将样品在20°C下孵育24小时。随后将样品板在20°C下以4000x g离心1小时。将50μL上清液分配到UV-Star®半区96孔μClear®微孔板(Greiner,675801)中。使用FLUOstar®Omega多检测微孔板读数器(BMG LABTECH™)通过UV分光光度法在280nm下测定蛋白质浓度。使用Graphpad prism ver 7.04将所得值绘图,从S形剂量反应(可变斜率)拟合的中点得到PEG中点(PEG_{mdpnt})评分。

[0945] 数据如表28所示,其中较高的PEG中点(%)相当于较高的浓度溶解度。NB*样品在PEG 3350的最低测试浓度(7.7%)下显示出聚集的迹象,因此无法生成准确的PEG中点。

[0946] 表28:pH 7.4的PBS和pH 5的缓冲液中的PEG聚集测定数据(PEG%中点值)

抗体	PBS pH 7.4	pH 5.0 缓冲液
[0947] HLA-G01	9.5	<7.7*
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	9.4	15.8
无岩藻糖基化的 HLA-G02	9.5	15.2
VR12389 gL2gH15	9.6	15.6

[0948] PEG聚集测定数据表明,所有测试样品在PBS中均表现出中等聚集倾向性。值得注意的是,HLA-G01在pH 5.0时表现出非常高的聚集倾向性。相反,VR12389移植体在pH 5.0的缓冲液中显示出低聚集倾向性。在常规(即岩藻糖基化的)HLA-G02与其无岩藻糖基化的对应物之间未观察到有意义的差异。

[0949] 实施例17:kD相互作用参数测量(胶体稳定性)

[0950] kD相互作用参数用于评估胶体稳定性,其中正值和负值分别与分子间排斥力和吸引力相关。

[0951] 动态光散射 (DLS) 在 DynaPro III 读数器 (Wyatt Technology Corp, Santa Barbara, CA, USA) 上进行。将样品在 pH 7.4 的 PBS 或 pH 5 的缓冲液中稀释至 30 μ L, 并以 1 mg/mL 的增量从 7 mg/mL 稀释至 1 mg/mL。选择含有缓冲液的孔作为溶剂补偿, 在 25 $^{\circ}$ C 下进行测量, 激光功率设置为 20% 并启用自动衰减。每次测量是一式三份 (5x3) 的五次、5s 扫描的平均值。测量扩散系数 (D_m) 并根据以下方程式计算相互作用参数 (kD), 其中 D_0 代表无限稀释时的扩散系数。

$$[0952] \quad D_m = D_0 (1 + k_p C)$$

[0953] 方程式: D_0 由 Y 轴截距处的 Debye 图给出。斜率 = $kD * D_0$ 。

[0954] 测量作为蛋白质浓度和用于评价胶体稳定性的 kD 的函数的扩散系数, 其中正值和负值分别表示分子间排斥力和吸引力。对于显示吸引力/自缔合的样品, 扩散系数作为蛋白质浓度的函数变得更大, 这反映在负 kD 值上。数据如表 29 所示。

[0955] 表 29: 抗 HLA-G 抗体的 kD 相互作用参数数据

样品	mL/g	
	PBS	Ac pH 5
[0956] HLA-G01	-9.93	-68.7
VR12389 gL2gH15	-9.30	-4.04
HLA-G02 (VR12389 gL2H16)	-7.92	-2.98

[0957] kD 相互作用参数经显示在 pH 5.0 时对 HLA-G01 呈高度负相关, 在 pH 7.4 时负相关较小, 表明在生理 pH 时胶体稳定性更好。VR12389 移植物具有较小的负 kD 值, 表明在任一 pH 下都具有良好的胶体稳定性。

[0958] 实施例 18: 机械应力对聚集稳定性的影响 (聚集测定)

[0959] 当暴露于气-液界面时, 蛋白质倾向于解折叠, 其中疏水表面呈现给疏水环境 (空气), 亲水表面呈现给亲水环境 (水)。蛋白质溶液的搅拌实现了可以驱动聚集的大气-液界面。该测定用于模拟分子在制造 (例如超滤) 过程中可能受到的应力并提供严格的条件, 以便尝试区分不同的抗体分子。

[0960] 使用 Eppendorf Thermomixer ComfortTM 通过涡旋对 pH 7.4 的 PBS 或 pH 5 的缓冲液中的样品施加压力。在涡旋之前, 将浓度调节至 1 mg/mL, 并使用 Varian Cary 50-Bio spectrophotometer[®] 获得 595 nm 处的吸光度, 以建立零时读数。将每个样品分装到 1.5 mL 锥形 Eppendorf[®] 型加盖试管 (3x250 μ L) 中, 并在 25 $^{\circ}$ C 下以 1400 rpm 的速度涡旋长达 24 小时。通过使用 Varian Cary[®] 50-Bio 分光光度计在涡旋后 3 小时和 24 小时在 595 nm 处测量样品来监测聚集 (浊度)。数据概括于表 30 中。

[0961] 表 30: 在 pH 7.4 的 PBS 和 pH 5 的缓冲液中, 气-液界面处的应力 (595 nm 处的浊度) 对抗 HLA-G 人源化移植物分子的影响。

抗体	OD 595nm			
	PBS pH 7.4		pH 5 缓冲液	
	3h	24h	3h	24h
	[0962] HLA-G01	0.005±0	0.029±0.011	0.003±0
VR12389 gL2gH15	0.006±0	0.016±0	0	0.065±0.010
HLA-G02 (VR12389 gL2gH16)	0.004±0	0.013±0.001	0	0.041±0.023
无岩藻糖基化的	ND	0.050±0.0043	ND	ND
[0963] HLA-G02				

[0964] 在涡旋后3小时,在pH 7.4的PBS缓冲液和pH 5的缓冲液中观察到所有抗体样品的低聚集倾向性(595nm处的低吸光度)。只有在较长的时间点(24小时)才能区分样品并评估缓冲液依赖性。在24小时时,与pH 7.4的PBS相比,在pH 5的缓冲液中有稍大的聚集倾向性,与VR12389移植物分子相比,HLA-G01也有稍大的聚集倾向性。在常规(即岩藻糖基化的)HLA-G02与其无岩藻糖基化的对应物之间未观察到有意义的差异。

[0965] 实施例19:疏水作用色谱(HIC)

[0966] 疏水作用色谱(HIC)按照疏水性递增的顺序分离分子。在高浓度极性盐存在的情况下,分子与疏水固定相结合,并随着盐浓度的降低而解吸到流动相中。较长的保留时间相当于较大的疏水性。

[0967] 将样品(2.0mg/mL)用1.6M硫酸铵、100mM pH 7.4的磷酸盐以1:2的比例稀释。将30 μg (30 μL)样品注入Dionex ProPac™ HIC-10柱(100mm x 4.6mm)中,该柱与带荧光检测器的Agilent 1200二元HPLC串联。通过内在荧光(激发和发射波长分别为280nm和340nm)监测分离。使用缓冲液A(0.8M硫酸铵,50mM磷酸盐,pH 7.4)和缓冲液B(50如下mM磷酸盐,pH 7.4),如下使用梯度洗脱分析样品,(i)在0% B下保持2分钟,(ii)在30分钟内从0% B至100% B的线性梯度(0.8mL/分钟)(iii)用100% B洗涤柱子2分钟,并在下一次样品注射之前在0% B中重新平衡10分钟。将柱温度保持在20℃。保留时间(以分钟为单位)如表31所示。

[0968] 表31. 抗HLA-G人源化抗体的疏水相互作用色谱

抗体	HIC保留时间(min)
HLA-G01	6.4
HLA-G02 (VR12389gL2gH16)	5.6
无岩藻糖基化的HLA-G02	5.6
VR12389gL2gH15	5.5

[0970] 所述分子显示出较早的洗脱时间,表明表观疏水性较低。据报道,低疏水势是理想的特性,并且可表明由于聚集倾向性降低而增加的可显影性(Jarasch A等人2015)。在常规(即岩藻糖基化的)HLA-G02抗体和其无岩藻糖基化的对应物之间没有观察到有意义的差异。

[0971] 实施例20:HLA-G组织交叉反应性

[0972] 使用为冷冻组织染色而优化的抗体 (“HLA-G Ab”) 研究了HLA-G在正常非肿瘤组织中的表达模式,所述抗体与HLA-G02识别相似的表位,令人惊讶的是,发现包含被HLA-G Ab结合的表位(因此也是HLA-G02结合的表位)的HLA-G的形式在健康组织中,特别是在胰腺和垂体组织中不表达。

[0973] 这与文献中先前报道的相反,文献中Cirulli等人(Cirulli等人,DIABETES,第55卷,2006年5月)报道了HLA-G蛋白在胰岛中的表达;他们观察到在支持细胞复制的细胞外基质上培养的胰岛细胞中HLA-G显著上调。还例如,Boegel等人(Boegel等人,BMC Medical Genomics(2018) 11:36)报道了垂体以及胰岛和睾丸中HLA-G的基因表达。

[0974] 方法:

[0975] 使用上述与HLA-G特异性结合的HLA-G抗体在人体组织中进行组织交叉反应性研究。该组织交叉反应性(TCR)研究的目的是使用免疫组织化学(IHC)技术,在冷冻人体组织和血涂片中使用缀合有FITC的HLA-G抗体评估HLA-G抗体的潜在交叉反应性。

[0976] 对一小组42个不同的冷冻正常人体组织和血液涂片(每组织三个供体)进行评估。使用设定为3和10 μ g/mL的两种浓度的HLA-G Ab-FITC,其中阴性对照IgG1-FITC的最高浓度为10 μ g/mL。

[0977] 结果:

[0978] HLA-G Ab-FITC在胎盘的绒毛外滋养层中产生膜状、可变的胞质染色。由于HLA-G是一种主要组织相容性基因,几乎只在胎儿-母体界面的绒毛外滋养层中表达(绒毛外滋养层侵入蜕膜和母体螺旋动脉),这种模式被认为代表HLA-G Ab的中靶结合(Goldman Whol, 2000)。

[0979] 相反,在下列组织中未观察到阳性染色:肾上腺、血细胞、骨髓、乳腺、盲肠、小脑、大脑皮层、结肠、十二指肠、内皮(脉管)、眼、食管、输卵管(输卵管)、胆囊、心脏、回肠、空肠、肾、肝、肺、淋巴结、肌肉、神经、卵巢、胰腺、腮腺、甲状旁腺、脑垂腺(pituitary gland)、前列腺、直肠、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、扁桃体、输尿管、膀胱、子宫(子宫颈和子宫内膜)。

[0980] 总之,发现包含由HLA-G抗体结合的表位的HLA-G形式仅在绒毛外滋养层细胞中表达(如文献中所报道的以及在本研究中用作对照的),而在任何其它测试的正常组织中不表达。

[0981] 因此,结果是令人惊讶的,并且表明与从现有技术的教导中所预期的相反,能够例如通过Fc介导的效应子功能杀死表达HLA-G的细胞的针对HLA-G的抗体代表了治疗实体瘤的潜在候选物,并且预期不会通过与正常组织结合而对患者产生毒性。事后,存在可以解释在该测定中获得的结果与文献中报道的结果相比的出乎意料的差异的潜在假设:i) 在垂体中报道的mRNA表达不一定表明膜蛋白表达。例如,mRNA可能不翻译成蛋白质,或者mRNA可能编码在冷冻组织中检测不到的一种或多种可溶性HLA-G同种型,并且由于它们不与膜结合,因此不会出现毒性问题。mRNA也可通过浸润免疫细胞而不是垂体细胞表达,ii) 商业抗体4H84用于检测胰腺中的HLA-G蛋白,并且已知该抗体是非特异性的。4H84还识别HLA-G的 α 1结构域中的表位,而本发明的抗体对HLA-G具有高度特异性并结合 α 3结构域。因此,在胰腺中表达的HLA-G同种型可能不含 α 3结构域,但仍可被 α 1结合剂(例如HLA-G3、HLA-G4、HLA-G7)检测到。在胎盘滋养层中检测到HLA-G阳性而在正常组织中未检测到表明本发明的抗体

可能能够结合肿瘤中表达的HLA-G蛋白,但可能不结合正常组织中的细胞,所述肿瘤含有结合HLA-G的免疫调节功能所需的 $\alpha 3$ 结构域的ILT2/4。

[0982] 如本文所述的这种抗体的双重机制(能够阻断HLA-G与其抑制性受体之间的相互作用,并能够杀死细胞)对于治疗HLA-G上调(诸如在实体癌中)的患者表现出相当大的优势。

[0983] 实施例21:HLA-G抗体在3D肿瘤模型中的功能特性

[0984] 使用Nilogen Oncosystems (Tampa, Florida, US) 3D肿瘤样模型技术在主要的离体人肿瘤样平台中评估HLA-G抗体活性。Nilogen的技术采用新鲜患者来源的肿瘤组织,并导致3D肿瘤类器官的生成,所述3D肿瘤类器官保留完整的肿瘤微环境(包括浸润性免疫细胞)并捕获完全的肿瘤异质性。该技术捕获了与临床中观察到的患者反应率相似的患者反应率,因此提供了用于评估候选免疫疗法治疗患者的潜力的模型。

[0985] 获得了10个结直肠腺癌肿瘤(CRC)和10个肾透明细胞癌肿瘤(RCC),并使用Nilogen的方法将每个肿瘤用于衍生成千上万个包含所有肿瘤细胞(肿瘤细胞、基质细胞、浸润性免疫细胞)和基质组分的肿瘤类器官。

[0986] 将分离的肿瘤类器官(每个治疗孔100-400个)在没有预先培养的情况下立即暴露于抗体72小时。使用Nilogen的3D-Explore™成像平台在24小时和72小时时评估肿瘤细胞死亡的水平。在24小时时收集培养基用于评估细胞因子水平。在72小时时将肿瘤类器官解聚并通过流式细胞术分析以评价对免疫细胞活化谱的作用。另外,在治疗前,通过流式细胞术分析肿瘤类器官以表征其细胞组成,并对每个肿瘤的FFPE切片进行HLA-G、ILT2和ILT4染色。

[0987] 通过与IgG1同种型对照比较,以活性IgG1形式分析HLA-G02抗体的活性。具有活性IgG1形式的抗PD-L1抗体用于比较。

[0988] 肿瘤细胞死亡

[0989] 分离后,立即在存在10mg/ml同种型对照IgG1、抗PDL1阳性对照或HLA-G02 IgG1的情况下培养每孔含有约100个肿瘤样细胞的培养物。培养24小时和72小时后,用活/死染料对肿瘤类器官进行染色,成像并使用专有算法计算死亡细胞百分比。

[0990] 结果如图13所示。图13A:用抗PDL1从RCC获得的数据。图13B:用抗PDL1从CRC获得的数据。图13C:用HLA-G02从RCC获得的数据。图13D:用HLA-G02从CRC获得的数据。数据表示为浅灰色的同种型对照、深灰色的抗PDL1或HLA-G02和抗PDL1或HLA-G02处理的培养物中的死亡细胞%,其中在黑色中观察到细胞死亡增加1.5倍或更多。

[0991] 每个肿瘤可能因患者而异,因此数据很好地代表了本发明抗体在治疗癌症,特别是RCC和CRC中的潜力。总之,数据显示本发明的抗体能够在肿瘤环境中和在反应完全依赖于浸润的免疫细胞的条件下杀死肿瘤细胞。有利的是,数据提供了抗体在某些肿瘤中可具有增强的细胞杀伤活性的证据。

[0992] 值得注意的是,随着时间的推移,死亡细胞从培养物中消失,24小时时的杀伤增加可能在72小时时不再被检测到。另外,对于抗PDL1阳性对照,共有5个肿瘤在24小时时显示细胞杀伤增加(1x RCC和4x CRC),在72小时时未观察到杀伤增加。对于HLA-G02,6个肿瘤显示在24小时时杀伤增加(2x RCC和4x CRC)和4个肿瘤显示在72小时时杀伤增加(1x RCC和3x CRC)。总共20个肿瘤中仅5个显示用抗PDL1的杀伤增强,而20个肿瘤中9个显示用HLA-

G02的杀伤增强。

[0993] 因此,数据表明,与抗免疫检查点诸如抗PD-L1相比,本发明的抗体在治疗实体瘤中可以有利的。

[0994] 实施例22:利用无岩藻糖基化的HLA-G02进行的组织交叉反应性测定

[0995] 使用与实施例20中所述相同的方法,使用无岩藻糖基化的HLA-G02进一步研究了HLA-G在正常非肿瘤组织中的表达模式。

[0996] 评估了一小组37种不同的冷冻正常人体组织和血液涂片(每种组织三个供体)(除垂体和胰腺(其中评估了8个供体)外)。使用设定为1和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的两种浓度的HLA-G Ab-FITC,其中阴性对照IgG1-FITC的最高浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0997] 人胎盘的冷冻切片和表达野生型HLA-G的细胞(HLA-G1)用作阳性对照样品。将人结肠HLA-G Nu11 1,2,3细胞(在突变成MHC I类共有氨基酸的3 α 结构域中的每一个中的HLA-G独特氨基酸)和未转染的细胞的冷冻切片用作阴性对照样品。使用nu11蛋白的目的是测试与其它MHC I类分子的潜在交叉反应性。

[0998] 结果,无岩藻糖基化的HLA-G02在胎盘绒毛外滋养层中产生膜状、可变的胞质染色,与先前报道的一致,但对于最佳浓度的无岩藻糖基化的HLA-G02没有观察到正常健康组织上的膜染色,这证实了无岩藻糖基化的HLA-G02不结合正常健康细胞的膜上暴露的任何表位。

[0999] 实施例23:通过FACS测定确定与JEG3细胞的结合亲和力

[1000] 使用天然表达HLA-G的JEG3在基于细胞的流式细胞术测定中测量了无岩糖基化的HLA-G02的结合亲和力。

[1001] 将JEG3细胞在微量离心管(Eppendorf)中于4 $^{\circ}\text{C}$ 与1.5ml无岩藻糖基化的HLA-G02溶液孵育两小时。IgG浓度范围为10nM至0.00046nM,稀释于PBS、1% FBS和0.1%的叠氮化钠中。将细胞转移到384孔V形底板(Greiner)中,并在测定缓冲液中洗涤三次,在4 $^{\circ}\text{C}$ 与20 μl 染色溶液一起孵育20分钟(R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG(H+L)(Jackson immunoresearch)-7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和存活力染料e780(Life Technologies))。洗涤步骤后,将细胞在10%中性缓冲福尔马林溶液(Sigma-Aldrich)中于室温避光孵育10min。然后洗涤细胞并将其重悬浮在20 μl PBS中。将样品在FACS Canto II仪器上以HTS模式运行,以测定PE阳性细胞的百分比。使用FlowJo分析软件根据中值荧光强度计算KD。

[1002] 结果证实,在该测定中,无岩藻糖基化的HLA-G02以高亲和力/亲合力结合JEG-3细胞上的HLA-G。如根据三次独立测定的几何平均值所测定的,无岩藻糖基化的HLA-G02的EC₅₀为0.021 \pm 0.001nM,该测定是高度可重复的,其中EC₅₀范围为0.020至0.021nM。

[1003] 实施例24:HLA-G02和无岩糖基化的HLA-G02在表达HLA-G的细胞的ADCC中的功效和效力

[1004] 方法:

[1005] 将HLA-G转染的HCT116(如先前实施例9中所述制备的)靶细胞铺板(2x10⁴个细胞/孔,于50 μL 的体积中)到聚丙烯圆底板中的合适培养基中。将抗HLA-G(常规HLA-G02或无岩藻糖基化的HLA-G02)或对照抗体(同种型IgG1或无岩藻糖基化的IgG1同种型)在相同培养基中制备成4X浓缩储备液,并将50 μl /孔加入合适的孔中。根据可用供体NK细胞的数量,以一式两份或一式三份对所有抗体进行测试。一些靶细胞不使用任何抗体,用作无处理对照。

[1006] 使用磁珠试剂盒(Miltenyi Biotech)通过阴性选择从全血中分离原代人NK细胞。将纯化的NK细胞以测定所需的最小体积重悬于RPMI+10% FBS,2mM L-谷氨酰胺中。向测定板的适当孔中,在靶细胞和抗体的顶部加入100 μ l/孔NK细胞。

[1007] 对于效应子:靶滴定实验,将NK细胞稀释并铺板(100 μ L/孔)到含有靶细胞和抗体的96孔测定板中,得到20:1至0.313:1的最终效应子:靶标比率范围。

[1008] 将测定板在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下孵育2.5至3小时。2.5至3小时后,通过流式细胞术测量活靶细胞的数量。将测定板以300g离心2分钟以沉淀细胞,并对每个孔的上皮细胞标志物Epcam和NK细胞标志物CD56染色。将染色抗体(抗Epcam PE和抗CD56 BV421)在细胞染色缓冲液中稀释至1/100,并向每个孔中加入100 μ L/孔。将该板在室温下孵育15分钟。染色后,用150 μ l/孔PBS洗涤细胞两次,并在每次洗涤之间以300g离心平板3分钟。在染色结束时,将每个孔中的细胞重悬于最终体积为125 μ L/孔的含有50nM TO-PROTM-3细胞活力染料的PBS中。

[1009] 30秒后,在BD FACS Canto II仪器上从每个孔中准确采集100 μ L样品,并使用FlowJoV10.60软件分析数据。确定每个孔的活靶细胞总数。活靶细胞首先被鉴定为TO-PROTM-3阴性,然后被鉴定为CD56阴性和SSC高。然后针对Epcam和GFP表达(HCT116)对细胞进行门控。计算每个测试样品相对于未处理细胞或同种型对照的耗竭百分比,并将数据转移到GraphPad Prism 8.1.1软件进行分析。

[1010] 结果:

[1011] 数据如下表32和图14所示。对于给定的供体,在所有效应子:靶标比率下,当细胞用无岩藻糖基化的HLA-G02处理时,与其常规(即岩藻糖基化的)对应物相比,观察到更高的最大平均耗竭。重要的是,HLA-G阳性HCT116细胞在低于1:1的低效应子:靶标比率下仍被耗竭。对于无岩藻糖基化的HLA-G02及其常规(即岩藻糖基化的)对应物,在0.625:1的效应子:靶标比率下观察到的平均耗竭仍然分别为46.63%和38.15%。这在肿瘤微环境中可能是重要的,在肿瘤微环境中,免疫细胞诸如NK细胞的数量通常是有限的。这些实验证实,与常规IgG1形式的抗体相比,HLA-G02的无岩藻糖基化增强了该分子的耗竭活性。

[1012] 表32:不同E:T比率下HLA-G+GFP+转染的HCT116细胞的平均耗竭

E:T 比率	HLA-G02			无岩藻糖基化的 HLA-G02		
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 1	供体 2	供体 3
20:1	49.58	58.46	23.26	89.07	87.19	51.67
10:1	50.80	51.95	15.33	87.05	80.85	40.75
5:1	56.48	45.42	14.88	84.72	73.50	34.03
2.5:1	51.78	41.11	3.49	77.15	66.73	18.99
1.25:1	48.16	34.11	-4.09	69.57	64.42	2.17
0.625:1	38.15	32.88	-17.56	46.63	46.11	-7.15
0.313:1	9.94	32.75	-16.85	19.30	52.57	-8.06

[1013] 实施例25:在PBMC实验中评估的无岩藻糖基化的HLA-G02的特异性

[1015] 使用来自10个不同供体的PBMC进一步确认了无岩糖基化的HLA-G02的特异性,所

述供体代表了多种HLA-I等位基因。目的是确认抗HLA-G抗体是特异性的,并且不与PBMC,特别是CD4+T淋巴细胞上表达的其它HLA-I分子发生交叉反应。

[1016] 从外周静脉血中纯化PBMC,并将其在冷冻培养基(90% FBS+10% DMSO)中储存于液氮中。将来自10名不同供体的PBMC解冻并重悬于1ml完全RPMI培养基(RPMI 1640培养基+10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素)中。将细胞以300rpm离心10min,并用PBS洗涤两次。将细胞沉淀重悬于1ml Facs缓冲液(PBS,0.5% BSA和2mM EDTA)中,并将细胞以50 μ l细胞悬浮液/孔接种于96孔板中。

[1017] 细胞用抗人CD4-APC(Biolegend,2.5 μ l/孔)和抗HLA-G抗体(无岩藻糖基化的HLA-G02或两种对照“pan-HLA”,两种与HLA-I结合且对HLA-G非特异的IgG1)或同种型对照(每孔50 μ l的20 μ g/ml的溶液)染色。将细胞在室温下于黑暗中孵育20min,然后用Facs缓冲液洗涤两次,并重悬于50 μ l含有二抗山羊抗人IgG-FITC(Jackson ImmunoResearch,稀释度1/100)的Facs缓冲液中。将细胞在室温下于黑暗中再孵育20min,然后用Facs缓冲液洗涤两次。将细胞重悬于100 μ l/孔的Facs缓冲液中,并在Canto II(HTS1)上采集样品,每个样品收集10,000个事件。使用FlowJo软件v10.6.0通过测量每个供体的每个CD4+细胞群的平均荧光强度(MFI)进行分析。使用Graphpad Prism软件绘制图表。

[1018] 结果如图15所示。图15显示了与两种pan-HLA抗体相比,特异性抗HLA-G抗体无岩藻糖基化的HLA-G02在10个不同供体中缺乏与CD4 T细胞的结合。数据以每个供体的平均荧光强度(MFI)表示。

[1019] 实施例26:无岩藻糖基化的HLA-G02介导的补体依赖性细胞毒性的评估

[1020] 方法:

[1021] 以下方法用于评估由无岩藻糖基化的HLA-G02(“aF HLA-G02”)介导的CDC:给HLA-G- β 2m-Reh细胞装载荧光钙黄绿素-AM染料,并将其在37 $^{\circ}$ C下在混合人血清存在的情况下在抗体溶液中孵育2小时。沉淀细胞并收集上清液。使用分光光度计对上清液中的荧光进行定量,以对细胞裂解进行定量。在Excel中处理数据,并导出到Prism中绘制曲线,从而允许计算每个测试样品的EC₅₀(最大有效浓度的一半)和E_{max}(最大有效浓度)。下面提供了方法的细节。

[1022] 细胞系

[1023] Reh细胞系(ATCC CRL-8286)表现出淋巴母细胞形态学,是从急性淋巴细胞白血病患者的人体组织中分离而来的。人淋巴母细胞HLA- β 2m-Reh细胞系是稳定表达人HLA-G和 β 2微球蛋白的多克隆细胞库。为了创建HLA-G- β 2m-Reh细胞系,将经HLA-G和 β 2微球蛋白密码子优化的序列克隆到哺乳动物基因表达慢病毒载体中,并包装到慢病毒(pLV-Neo-EF1A-HumanHLA-G:IRES:HumanB2m;Vectorbuilder)中。Reh细胞用HLA-G- β 2m慢病毒以30的感染复数接种,之后将转染的细胞维持在含有庆大霉素(1mg/ml)的培养基中。7天后,通过流式细胞术对细胞上HLA-G的表达进行定量。简言之,未转染的Reh和HLA-G- β 2m-Reh细胞被PE标记的HLA-G抗体(MEM-G/9;Invitrogen)结合,并对抗体与细胞表面的结合进行了定量。同时对Quantibrite珠粒(BD)的荧光进行了定量。通过使用这些珠粒,HLA-G- β 2m-Reh细胞的细胞表面上的HLA-G受体的平均数量被测定为76665个。将HLA-G- β 2m-Reh细胞系维持在补充有胎牛血清(FBS,10%)和谷氨酰胺(1%)以及庆大霉素(1mg/ml)的RPMI-1640中。

[1024] CDC测定

[1025] 在从供应商处收到后,将混合人血清解冻并等分。将其在80℃下储存直至使用。。临使用前,让血清在室温下在工作台上解冻。根据需要,

[1026] 通过在56℃下加热30分钟来灭活血清。将HLA-G-β2m-Reh细胞以300x g离心3min,吸出上清液,将细胞以 1×10^7 个细胞/ml重悬于PBS中。加入钙黄绿素-AM (10μM),将HLA-G-β2m-Reh细胞在37℃孵育1小时。以300x g离心细胞3min,吸出上清液,并将细胞重悬于测定缓冲液中。总共重复两次洗涤。最后一次洗涤后,将细胞以 0.2×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于测定培养基(RPMI-1640,2% FBS,1%谷氨酰胺)中。将细胞分散在384孔V形底板(50μl/孔)中。

[1027] 制备活性或无活性的合并的人补体血清溶液(1份血清,4份测定介质)并根据需要分配到测定板(25μl/孔)中。

[1028] 在测定介质中,在96孔V形底板中产生了非无岩藻糖基化的HLA-G02

[1029] 的一系列稀释液。最初,在测定介质中制备400nM的最高浓度。使用Assist(Integra)将该溶液在整个平板上以1:3稀释,形成10点连续稀释液。制备含有测定介质的额外孔,用于评估背景荧光(MIN)和最大裂解(MAX)。

[1030] 使用Viaflo(Integra),以一式两份将测试试剂(3.7mg/ml的无岩藻糖基化的HLA-G02或1mg/ml的人IgG₁同种型对照抗体;25μl)和MIN/MAX对照(25μl)从96孔板转移到384孔板。

[1031] 测定板用透气膜密封,短暂涡旋并以300x g离心10秒。将测定板在37℃和5% CO₂下孵育2小时。

[1032] 2小时的孵育期后,通过移液操作将10μl裂解缓冲液(10% Triton-X,测定培养基)加入到所有MAX对照孔和混合孔中。将测定板在37℃和5% CO₂下孵育10min。将测定板以300x g离心3min。

[1033] 使用Viaflo(Integra),从每个孔中取出40μl上清液,并转移到384孔黑壁、平坦、透明底板中。小心不要扰乱细胞沉淀。

[1034] 将新的测定板以1000x g离心5分钟。在分光光度计上分析新的测定平板,其中激发为488nm,发射为520nm。

[1035] 统计分析

[1036] 将荧光发射数据导出至Excel。将荧光信号以含有测定缓冲液(MIN)和1% Triton X-100(MAX)的处理孔的平均值作归一化,以产生在给定测试试剂的浓度下达到的裂解百分比。

[1037] 使用Graphpad **Prism**®8.0软件进行4参数逻辑拟合(4-PL)曲线拟合和EC₅₀值的计算。

[1038] 结果:

[1039] 血清灭活对HLA-G-β2m-Reh细胞系裂解的影响

[1040] 结果证实活性人血清对于HLA-G02介导的HLA-G-β2m-Reh细胞的CDC是必需的。当通过加热使血清失活时,aF HLA-G02不能介导CDC。数据如图16A所示。

[1041] 耗竭对HLA-G的依赖性

[1042] 在活性人血清存在的情况下,aF HLA-G02以浓度依赖的方式介导HLA-G-β2m-Reh细胞系的裂解。直至100nM的最大aF HLA-G02浓度都没有观察到亲代Reh细胞系的裂解。数据

如图16B所示。

[1043] HLAG- β 2m-Reh细胞的CDC

[1044] 结果证实在活性血清存在的情况下, aF HLA-G02介导HLAG- β 2m-Reh细胞的CDC。在100nM至0.0051nM的浓度范围内测试了aF HLA-G02。aF HLA-G02的 EC_{50} 为 3.17 ± 0.60 nM, 如由三次独立测定的平均值所确定的。数据概括于下表33和34中, 并在图16C中进行了可视化显示。

[1045] 表33: 不同浓度的aF HLA-G02介导的裂解(%)、 EC_{50} 和 E_{max} 数值由三个独立的实验计算而来。

aF HLA-G02 批次	浓度(nM)下的裂解率(%)											EC_{50} (nM)	E_{max} (%)
	100.0	33.3	11.1	3.70	1.23	0.41	0.14	0.046	0.015	0.0051			
1	68.5	67.9	64.3	46.2	11.5	1.8	-0.4	-0.7	-0.6	0.3		2.51	68.5
2	66.2	63.1	57.4	35.6	3.7	-0.4	-1.8	-1.3	-1.6	-1.5		3.29	66.2
3	54.9	54.8	50.9	26.5	7.8	2.0	-2.0	-2.0	-1.9	-1.9		3.70	54.9

[1047] 表34: 平均 EC_{50} 和 E_{max} (SEM(平均值的标准误差))的概述

aF HLA-G02 (N=3)	EC_{50} (nM)		E_{max} (%)	
	平均值	SEM	平均值	SEM
	3.17	0.60	63.2	7.23

[1049] 结论:

[1050] 无岩藻糖基化的HLA-G02与HLAG- β 2m-Reh的结合触发了强效和有效的补体依赖性裂解($EC_{50} = 3.17 \pm 0.60$ nM; $E_{max} = 63.2 \pm 7.23$ %)。

[1051] 为了确保观察到的溶解是CDC介导的, 使用热灭活的血清进行了探索性研究。研究表明, 只有在活性混合人血清存在时, 无岩藻糖基化的HLA-G02才会触发HLAG- β 2m-Reh细胞的裂解。当混合人血清因长时间暴露于高温而失活时, 无岩藻糖基化的HLA-G02介导CDC的能力丧失。

[1052] 为了确保观察到的裂解是HLA-G依赖性的, 在活性混合人血清存在的情况下, 将亲代未转染的Reh细胞系暴露于无岩藻糖基化的HLA-G02。结果表明, 在测试的浓度范围内, 无岩藻糖基化的HLA-G02不能介导Reh细胞的CDC。然而, 在相同的浓度范围内, 无岩藻糖基化的HLA-G02在介导HLAG- β 2m-Reh细胞的CDC方面是强效且有效的。

[1053] 总之, 这些结果证明了无岩藻糖基化的HLA-G02在介导表达HLA-G的细胞的CDC方面的选择性、效力和效率。

[1054] 实施例27: 由呈不同活性和无活性Fc形式的HLA-G02介导的吞噬作用, 以及HLA-G02与抗CD47抗体的组合治疗

[1055] 本研究的目的是使用体外巨噬细胞依赖性吞噬测定评估无岩藻糖基化的HLA-G02促进巨噬细胞介导的表达HLA-G的肿瘤细胞的吞噬的能力。

[1056] 我们研究了无岩藻糖基化的HLA-G02在以以下不同Fc形式表达时指导表达HLA-G的K562靶细胞的吞噬的能力:能够与巨噬细胞上表达的Fc受体相互作用的“活性”Fc形式(无岩藻糖基化的HLA-G02及其常规(即岩藻糖基化的)对应物,用以评估抗体Fc优化的影响),和与Fc受体相互作用的“非活性”Fc形式(HLA-G02 IgG4P FALA),用以评估不依赖于FcR的作用机制的可能性。

[1057] 在这些研究中,抗CD47抗体被用作阳性对照。CD47广泛地在人细胞上表达,与髓样细胞上的受体SIRP α 相互作用以阻止吞噬作用。CD47经显示在肿瘤细胞中过表达,目前正在临床试验中测试促进肿瘤细胞吞噬的抗CD47阻断抗体。

[1058] 另外,我们测试了利用抗CD47和无岩藻糖基化的HLA-G02的组合治疗的潜在效果。

[1059] 方法:

[1060] 使用人Pan单核细胞分离试剂盒(Miltenyi)(一种用于分离未接触单核细胞的间接磁性标记系统),从外周静脉血中纯化CD14⁺单核细胞。在37°C、5% CO₂下于完全RPMI培养基(RPMI 1640培养基加10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素)中用50ng/ml重组MCSF将细胞分化成巨噬细胞,进行7天。

[1061] 使用4D-Nucleofector系统和SF细胞系4D-NucleofectorTM X试剂盒L(Lonza, ref#V4XC-2024)对HLA阴性红白血病K562细胞进行模拟转染或用HLA-G和B2m转染,并在37°C、5% CO₂下于完全RPMI中培养24小时。第二天,收获细胞,洗涤并用细胞痕量黄(Cell Trace Yellow)(ThermoFisher)标记,再次洗涤并以每孔25,000个细胞的密度铺在96孔圆底超低附着平板(Corning Costar)中的100 μ l完全RPMI中。随后将细胞与10 μ g/ml的抗CD47抗体或抗HLA-G抗体或同种型对照在37°C、5% CO₂下孵育1小时。洗涤后,将细胞与单核细胞来源的巨噬细胞(每孔50,000个巨噬细胞)以巨噬细胞:细胞靶标=2:1的比例混合。将混合后的细胞在37°C、5% CO₂下孵育2小时。然后,在4°C下将细胞洗涤并重悬于PBS加10%纯化的人Fc γ -结合抑制剂(ThermoFisher)中20分钟,然后在4°C下用抗CD11b-APC(Biolegend)染色20分钟。洗涤细胞,在DAPI(500ng/ml)存在的条件下,重悬于PBS加2mM EDTA加0.5% BSA中,排除死细胞。在BD FACSCanto上通过流式细胞术采集样品。使用FlowJo软件v10.6.0通过测量对应于作为CTY+CD11b⁺双阳性细胞的巨噬细胞的百分比的吞噬百分比来进行分析。

[1062] 将来自重复的数据以相应的同种型对照作归一化,并表示为相对于对照的耗竭%(消耗%=100-[(平均靶细胞aF HLA-G02) x 100/(平均靶细胞同种型对照)]。

[1063] 使用Graphpad Prism软件将数据导出至excel文件并生成图表。

[1064] 结果:

[1065] HLA-G02和无岩糖基化的HLA-G02介导的吞噬作用

[1066] 模拟转染的细胞和HLA-G转染的细胞(将模拟转染的细胞在HLA-G DNA不存在的情况下接受转染方案)的吞噬作用的比较表明,与诱导两种细胞类型的吞噬作用的阳性对照抗CD47抗体相比,无岩藻糖基化的HLA-G02(及其岩藻糖基化的对应物)介导的ADCP对表达HLA-G的细胞具有特异性。与同种型对照相比,对于常规HLA-G02和无岩藻糖基化的HLA-G02均观察到表达HLA-G的靶细胞的浓度依赖性吞噬作用。对于浓度始于0.001 μ g/mL的无岩藻糖基化的HLA-G02观察到不断增强的吞噬作用。与常规岩藻糖基化的HLA-G02相比,无岩藻糖基化的HLA-G02显示出对巨噬细胞介导的吞噬作用的极小增强作用。结果如图17所示。

[1067] 无岩藻糖基化的HLA-G02介导的靶细胞杀伤

[1068] 与同种型对照相比,通过比较在用无岩藻糖基化的HLA-G02或抗CD47抗体进行规定时间(过夜)的吞噬后剩余的靶细胞数量来评估对表达HLA-G的靶细胞的杀伤。数据显示,两种抗体都诱导了相似的浓度依赖性靶细胞耗竭。无岩藻糖基化的HLA-G02处理导致在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下的 $22.0 \pm 10.8\%$ 的靶细胞耗竭和在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下的 $44.8 \pm 8.6\%$ 的靶细胞耗竭,抗CD47处理分别导致 $11.3 \pm 10.4\%$ 和 $43.3 \pm 10.8\%$ 的靶细胞耗竭。结果如图18所示。

[1069] 目前在临床试验中测试作为癌症治疗剂的抗CD47抗体。我们随后研究了利用无岩藻糖基化的HLA-G02和抗CD47抗体的组合治疗是否会将HLA-G表达细胞的吞噬作用提高到比单独使用任一种剂观察到的水平更高的水平。在该实验中,用抗CD47抗体(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与浓度递增的无岩藻糖基化的HLA-G02或HLA-G02 IgG4P FALA的组合处理HLA-G表达细胞。图19显示了代表性数据,图20显示了几个供体的组合数据。

[1070] 包括IgG4P FALA形式来确定对于无岩藻糖基化的HLA-G02观察到的增强的吞噬作用是否依赖于其活性Fc形式。单独的无岩藻糖基化的HLA-G02以其无岩藻糖基化的IgG1形式诱导了浓度依赖性吞噬作用。HLA-G02 IgG4P FALA也增强了吞噬作用,尽管程度较低。与IgG1不同,IgG4P FALA不能通过Fc受体诱导ADCP,这清楚地表明对于HLA-G02 IgG4P FALA观察到的吞噬作用是通过阻断HLA-G与其在巨噬细胞上的受体ILT2/4结合来介导的。此外,数据显示抗CD47和无岩藻糖基化的HLA-G02的组合,无论以哪种形式存在,都会导致HLA-G表达细胞的吞噬作用增强。

[1071] 总之,该研究表明,无岩藻糖基化的HLA-G02及其常规(即岩藻糖基化的)对应物都诱导了HLA-G表达细胞的特异性抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。HLA-G02的IgG4P FALA形式也增强了吞噬作用,但程度较低。数据表明无岩藻糖基化的HLA-G02及其岩藻糖基化的对应物通过以下两种作用机制促进吞噬作用:(1)通过Fc受体介导的抗体依赖性细胞吞噬作用和(2)通过阻断HLA-G与其受体的相互作用。

[1072] 此外,我们发现无岩藻糖基化的HLA-G02与靶向吞噬检查点CD47的抗体的组合一起增强了HLA-G表达细胞的吞噬作用。

[1073] 实施例28:无岩藻糖基化的HLA-G02介导的细胞因子释放

[1074] 细胞因子释放测定(CRA)提供了用于评估新型疗法诱导免疫细胞释放细胞因子的潜力的方法。通常,这些测定使用外周血单核细胞(PBMC)或全血,在测量促炎细胞因子之前用目标治疗剂进行处理。

[1075] 本研究旨在评估可溶性无岩藻糖基化的HLA-G02对来自16名PBMC供体的促炎细胞因子释放的影响,并将细胞因子水平与已知的阳性对照进行比较。使用MSD多重夹心免疫测定法测量细胞因子释放。在无岩藻糖基化的HLA-G02处理的PBMC与JEG3细胞(其表达高水平的HLA-G)共培养后,也测量了细胞因子释放的水平。这种共培养旨在模拟活性Fc耗竭机制后HLA-G阳性肿瘤微环境中细胞因子释放的潜在水平。

[1076] 方法:

[1077] 根据标准方法从人全血中分离PBMC。在RPMI完全培养基中以 4×10^5 个细胞/mL的密度培养和维持JEG3细胞。向96孔平底组织培养板的适当孔中加入JEG3细胞(50 μL /孔)。对于仅有PBMC的孔,将50 μL RPMI完全培养基(RPMI 1640(500mL)+10% FBS(50mL)+2mM Glutamax™(5mL))铺板以代替JEG3细胞。

[1078] 将无岩藻糖基化的HLA-G02稀释至起始浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最大终浓度的4倍),然后连续稀释至100、40、4、0.4、0.04、0.004和0.0004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以得到25、10、1、0.1、0.01、0.001和0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度)。仅在最高抗体浓度(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下制备同种型对照抗体和抗CD3抗体,分别用作阴性和阳性对照。作为替代阳性对照,也将LPS在RPMI完全培养基中稀释至400 ng/mL (为100 ng/mL 的终浓度的4倍)。一旦稀释,就将测试抗体/物质以一式三份(50 $\mu\text{L}/\text{孔}$)铺板在96孔平底测定板中的JEG3或培养基的顶部。

[1079] 然后将PBMC铺板到平底板中的抗体顶部上-100 μL (1×10^5) 细胞/孔。每孔中的总体积为200 μL 。然后将测定板转移到37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度的培养箱中进行24小时。

[1080] 24小时后,将96孔培养板以400g离心3min,以确保每个孔的上清液中没有细胞残留。将每个孔中的150 μL 上清液转移到新的96孔板中,并将样品于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存直至进行多重检测。

[1081] 根据制造商的说明,使用MSD Proinflammatory Panel 1试剂盒测量上清液中的细胞因子水平。

[1082] 结果:

[1083] 在表达HLA-G的JEG3细胞存在或不存在的条件下,从用50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 无岩藻糖基化的HLA-G02、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 同种型对照、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD3或100 ng/mL LPS处理的16名PBMC供体释放的10种促炎细胞因子的平均水平概括于下表35中。图21 (A-F) 中概括了在JEG3细胞存在和不存在的条件下,关键细胞因子IFN、TNF、IL2、IL6、IL8和IL10在0.0001至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HLA-G02的浓度范围内产生的平均值。

[1084] 表35:释放的10种促炎细胞因子的平均水平

16名供体的平均值 (三个重复)	仅 PBMC				PBMC+JEG3 细胞			
	LPS	CD3	同种型	aF HLA-G02	LPS	CD3	同种型	aF HLA-G02
IFN- γ (pg/mL)	8260.6	7399.0	302.0	56.8	26772.7	8792.0	81.0	177.9
IL-10 (pg/mL)	148.0	64.4	4.5	3.1	522.5	112.0	2.3	26.9
IL-12p70 (pg/mL)	30.8	5.9	0.7	0.7	24.2	9.2	3.2	6.5
IL-13 (pg/mL)	95.4	58.6	11.5	26.1	168.0	95.4	27.5	120.1
IL-1 β (pg/mL)	1401.9	34.7	5.9	3.1	1065.1	30.3	12.6	10.4
IL-2 (pg/mL)	85.5	212.0	26.5	6.6	274.8	247.2	7.0	17.1
IL-4 (pg/mL)	13.0	3.8	0.5	0.2	21.2	6.6	0.3	1.3
IL-6 (pg/mL)	7070.3	55.0	15.7	10.5	7392.0	114.7	52.8	41.5
IL-8 (pg/mL)	10119.9	8234.4	681.5	1531.1	35308.6	8618.2	565.1	7706.5
TNF- α (pg/mL)	1712.5	865.9	68.0	55.5	844.0	415.2	14.4	64.6

[1086] 从用50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 无岩藻糖基化的HLA-G02处理的PBMC产生低水平的10种促炎细胞因

子 (IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-1 β 、IL-2、IL4、IL-6、IL-8和TNF- α)。这种细胞因子释放水平与用同种型对照抗体处理PBMC时观察到的水平相当。根据所测试的细胞因子,用50 μ g/mL无岩藻糖基化的HLA-G02处理后产生的量分别比抗CD3和脂多糖(LPS)阳性对照低2至130倍或3.5至700倍。

[1087] PBMC与JEG3细胞的共培养,在用无岩藻糖基化的HLA-G02治疗后导致促炎细胞因子释放增加。与单独使用PBMC相比,在50mg/ml下,PBMC-JEG3共培养物上清液中9/10细胞因子(除TNF- α 外所有)的水平升高。根据所测得的细胞因子,与单独的无岩藻糖基化的HLA-G02处理的PBMC相比,这种增加的范围介于3倍(IFN- γ 、IL1- β 、IL-2)变化与9倍(IL-10)变化之间。另外,在HLA-G02的浓度范围内,在表达HLA-G的JEG3细胞存在的情况下细胞因子的水平升高。

[1088] 在HLA-G表达细胞存在的情况下观察到的细胞因子释放增加提供了促炎细胞因子释放水平的指示,所述促炎细胞因子释放可作为用无岩藻糖基化的HLA-G02处理的HLA-G阳性肿瘤中Fc介导的活性的结果而发生。

[1089] 本发明中包括的12389抗体序列和人框架如下表36所示(“(nt.)”:核酸序列):

[1090] 表36:

[1091]

名称	序列	SEQ ID NO:
CDR-L1	QASQSIYSYLS	1
CDR-L2	KASTLAS	2
CDR-L3	QNHWNVGGNGWP	3
CDR-H1	GIDLSSNAMS	4
CDR-H2	TISSGGRTYYASWAKG	5
CDR-H3	GDGATGFNI	6
兔 VL	ALVMTQTPASVSEPVGTVTIKCQASQSIYSYLSW YQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKKGSGSGTQ FTLTISDLECGDAATYYCQNHWNVGGNGWPFGG	7

	GTEVVVK	
兔 VL (nt.)	gcccttgatgaccagactccagcctcctgtctgaacctgtgggaggcac agtcaccatcaagtccaggccagtcagagcatttacagctacttatcctggt atcagcagaaaccagggcagcctcccaagctcctaattacaaggcacccac tctggcatctggggtctcatcgcggttcaaaggcagtggtctgggacacagt tactctcaccatcagcgacctggagtgtggcgatgtgccacttactactgtc aaaatcattggaatgttggtggaatgggtggccttctggcgaggaggaccgag gtggtggtcaaa	8
兔轻链	ALVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSIYSYLSW YQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKGSQSGTQ FTLTISDLECGDAATYYCQNHWNVGGNGWPFGG GTEVVVKRTPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCV ANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSAD CTYNLSSTLTLTSTQYNLHKEYTCKVTQGTTSSVVQ SFNRGDC	9
兔轻链 (nt.)	gcccttgatgaccagactccagcctcctgtctgaacctgtgggaggcac agtcaccatcaagtccaggccagtcagagcatttacagctacttatcctggt atcagcagaaaccagggcagcctcccaagctcctaattacaaggcacccac tctggcatctggggtctcatcgcggttcaaaggcagtggtctgggacacagt tactctcaccatcagcgacctggagtgtggcgatgtgccacttactactgtc aaaatcattggaatgttggtggaatgggtggccttctggcgaggaggaccgag gtggtggtcaaacgtaagcagttgcactactgtctcatcttccaccagct gctgatcaggtggcaactggaacagtcaccatcgtgtgtgtggcgaaataat acttcccgatgtcaccgtcactgggagggtggatggcaccacccaaacaac tggeatcgagaacagtaaaacaccgcagaattctgcagattgtacctacaac ctcagcagcactctgacactgaccagcacacagtacaacagccacaaagag tacacctgcaaggtgaccagggcagacctcagtcgtccagagcttcaata ggggtgactgt	10

[1092]

兔 VH	<p>QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSSNAMSW VRQAPGEGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTISK TSTTVDLKIPSPTTEDTATYFCGRGDGATGFNIWG PGTLVTVSS</p>	11
兔 VH (nt.)	<p>cagtcggtggaggagtccegggggctgcctggcgcctgggacacccctga cactcaactgcacagtctctggaatcgacctcagtagcaatgcaatgagctgg gtcceccaggctccaggggaggggctggaatggatcggaaccattagtagt ggtggtaggacatactacgcgagctgggcaaaaggccgattcaccatctcca aaacctcgaccacggtggatctgaaaatccccagtcgacaaccgaggaca eggccacctattctgtggcagaggagatgggtgctactggctttaacatctgg ggcccaggcaccctggcaccgtctcgagt</p>	12
兔重链 (Fab)	<p>QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSSNAMSW VRQAPGEGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTISK TSTTVDLKIPSPTTEDTATYFCGRGDGATGFNIWG PGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLG CLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSS GLYSLSSVSVTSSSQPVTNCNVAHPATNTKVDKTV APSTCSKP</p>	13
兔重链 (Fab) (nt.)	<p>cagtcggtggaggagtccegggggctgcctggcgcctgggacacccctga cactcaactgcacagtctctggaatcgacctcagtagcaatgcaatgagctgg gtcceccaggctccaggggaggggctggaatggatcggaaccattagtagt ggtggtaggacatactacgcgagctgggcaaaaggccgattcaccatctcca aaacctcgaccacggtggatctgaaaatccccagtcgacaaccgaggaca eggccacctattctgtggcagaggagatgggtgctactggctttaacatctgg ggcccaggcaccctggcaccgtctcgagtgggcaacctaaaggetccatcag tcttcccactggccccctgctgceggggacacaccagctccacggtgacctg ggetgcctggcfaaaggctacctcccggagccagtgacctgacctggaact cgggcacctcaaccaatggggtagcaccctccgctccgctccgagctctca ggctctactcgtgagcagcgtgggtgagcgtgacctcaagcagccagcccg</p>	14

[1093]

	tcacctgcaacgtggccccaccagccaccaacaccaaagtggacaagaccg ttgcgcctcgacatgcagcaagccc	
12389gL 1 VL	aivltqspssslsasvsgdrvtitczaqsiysylswyqqkpgkapklliyk astlasgvpsrfsrgsgsgtqftltlslqpedfatyycqnhwnvgngwpfgg gtkveik	15
12389gL 1 VL (nt.)	gccattgtgtgactcagagcccgtcgactgagcgcttcctggggcgacag agtgaccatcactgtcaagccagccagtcctactctactctactgtcatggta ccagcagaagccagggaaagccccgaagctgctgatctacaagcctctac ccttgcgtccggagtgccttegggttttegggttccgggtccggaaactcagttc acgtcaccattagctccctccaaccgaggatttcgcaactactattgcca aaaccaactggaacgtcgggggcaatggctggcccttcggaggaggcactaa ggtcgaaatcaag	16
12389gL 1 轻链	AIVLTQSPSSLSASVSGDRVTITCQASQSIYSYLSWY QQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTQF TLTISSLQPEDFATYYCQNHWNVGGNGWPFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	17
12389gL 1 轻链 (nt.)	gccattgtgtgactcagagcccgtcgactgagcgcttcctggggcgacag agtgaccatcactgtcaagccagccagtcctactctactctactgtcatggta ccagcagaagccagggaaagccccgaagctgctgatctacaagcctctac ccttgcgtccggagtgccttegggttttegggttccgggtccggaaactcagttc acgtcaccattagctccctccaaccgaggatttcgcaactactattgcca aaaccaactggaacgtcgggggcaatggctggcccttcggaggaggcactaa ggtcgaaatcaagcgtaacggtagcggccccatctgtcttcttcccgccatc tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactt ctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatc gggtaactccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacct	18

[1094]

	acagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac aaagtctacgctggaagtcacccatcaggcctgagctgcccgtcaaa agagcttcaacaggggagagtgt	
12389gL 2 VL	AIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIYSYLSWY QQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQNHWNVGGNGWPFGGGT KVEIK	19
12389gL 2 VL (nt.)	gccattgtgctgactcagtcaccgagctcacttagcgcctcctgggggaccg ggtcacaatcacttgccaagcgtcgcagcaatctactcgtacctctcgtggta tcagcagaagcctgggaaggcacctaaactcctgatctacaaggettcaact ttggcatctggagtgccgagcagattcagcggatcgggaagcggaaactgatt ttaccctcactatctcgtcgtccaaccggaagatttegcgacctactactgtc aaaaccattggaatgtcggtggaaacggttggccttctggcgggggaaccaa agtggagattaag	20
12389gL 2 轻链	AIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIYSYLSWY QQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQNHWNVGGNGWPFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	21
12389gL 2 轻链 (nt.)	gccattgtgctgactcagtcaccgagctcacttagcgcctcctgggggaccg ggtcacaatcacttgccaagcgtcgcagcaatctactcgtacctctcgtggta tcagcagaagcctgggaaggcacctaaactcctgatctacaaggettcaact ttggcatctggagtgccgagcagattcagcggatcgggaagcggaaactgatt ttaccctcactatctcgtcgtccaaccggaagatttegcgacctactactgtc aaaaccattggaatgtcggtggaaacggttggccttctggcgggggaaccaa agtggagattaagcgtacggtggcgcctcctcctcctggttcattctccaccctc	22

[1095]

[1096]

	cgacgagcagctgaagtccggcaccgctccgctcgtgtgctgctgaacaac ttctacccccgagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagt ccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacct actccctgtctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcaca gggtgacgctgcaagtgaaccaccaggcctgtccagccccgtgaccaag tcctcaaccggggcgagtgc	
12389gL 3 VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCQASQSIYSYLSWY QQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQNHWNVGGNGWPFGGGT KVEIK	23
12389gL 3 VL (nt.)	gccattcagttgactcagagcccgtcactgagcgttccgtgggacag agtgaccatcacctgtcaagccagccagtcactctactctacctgtcatggta ccagcagaagccagggaaagccccgaagctgctgatctacaaggcctctac ccttgcgtccggagtgccttcgggttttcgggttcgggtccggaactgacttc acgtcaccattagctccctccaaccgaggatttcgcaacctactattgcca aaaccactggaacgtcgggggcaatggctggcccttcggaggaggcactaa ggtegaaatcaag	24
12389gL 3 轻链	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCQASQSIYSYLSWY QQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQNHWNVGGNGWPFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	25
12389gL 3 轻链 (nt.)	gccattcagttgactcagagcccgtcactgagcgttccgtgggacag agtgaccatcacctgtcaagccagccagtcactctactctacctgtcatggta ccagcagaagccagggaaagccccgaagctgctgatctacaaggcctctac ccttgcgtccggagtgccttcgggttttcgggttcgggtccggaactgacttc	26

[1097]

	<p>acgctcaccattagctccctccaaccecgaggatttcgcaacactactattgcca aaaccactggaacgtcgggggcaatggctggccctcggaggaggactaa ggtegaaatcaagcgtacggtagcggccccatctgtcttcatcttcecgccatc tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataactt ctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatc gggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacct acagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac aaagtctacgctgccaagtcaccatcagggctgagctcgcccgtcaca agagcttcaacaggggagagtgt</p>	
12389gH 1 VH	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSS</p>	27
12389gH 1 VH (nt.)	<p>gaagtgcagctggctgcaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcacgcgggtgtccggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacaggccccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gctggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaaccttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgaggggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc</p>	28
12389gH 1 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</p>	29

	<p>WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ENSGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 1 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcctatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgceatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcctgagggga gaggacctgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgtcttacaaggg cccatcgggttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcaag cggccctgggctgcctggtaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgc gtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtccta cagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagcag cttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtagacaaaactcacacatgccc caccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgccc tgggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacct ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagct acaacagcagctacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagc cccatcgagaaaacctctccaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccctcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcag cctgacctgctggtcaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctgg actcgcagggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaa</p>	<p>30</p>

[1098]

	ccactacacgcagaagagcctctcctgtctcgggtaaa	
12389gH 1 重链 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	31
[1099] 12389gH 1 重链 (IgG4P) (nt.)	gaagtgcagctgggtcgaatcggggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggeccctggcaaagggtggagtggtggcaccatctcaa gcggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgetgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaagg cccatcgtcttccccctgggcctgctccaggagacctccgagagcacag ccgccctgggctgctggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctac agtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagc ftgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtcacaaataggteccccatgcccaccatgcc cagcacctgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcactgctggtggtggtgg	32

[1100]

	<p>acgtgagccaggaagaccccgagggtccagttcaactggtaactggtgacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagegtcctcaccgtctcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtctccategaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgeccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtcaaaggettctaccccagegacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg ctcttctctctacagcaggttaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac acagaagagcctctcccgtctctgggtaaa</p>	
12389gH 4 VH	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSS</p>	33
12389gH 4 VH (nt.)	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgegettgtcatgegeggcttceggcattgaccttagctccaagccatgaget gggtcagacagggccccggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggaggggggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc</p>	34
12389gH 4 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP</p>	35

	<p>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 4 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgcgcggcttcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgetgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcggttctccccctggcaccctcctccaagagcactctgggggcaag cggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgc gtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccgggtgtccta cagtctcaggacttactcctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcag ctfgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagcccaatcttgtagacaaaactcacacatgac caccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgag tggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgt ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagt acaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcag cctgacctgctgtgcaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgagg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccaagcctcccgtgctgg</p>	<p>36</p>

[1101]

[1102]

	actccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgttctctcatgtccgtgatgcatgaggctctgcaaa ccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa	
12389gH 4 重链 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	37
12389gH 4 重链 (IgG4P) (nt.)	gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgcgcggcttccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggeccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgetgagggea gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcagagcgttctacaaggg cccatcgtcttccccctgggcctcctgctccaggagcacctccgagagcacag ccgcccctgggctgctgtgcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcaggeccctgaccageggcgtgcacacctcccggctgtctac agtctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagc ftgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtcctcaaatatggtecccatgcccaccatgccc	38

[1103]

	<p>cagcacctgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaaacce aaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtgg acgtgagccaggaagaccccgaggtccagtcaactggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagegtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtctccategaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtaaaaggettctaccccagegacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg ctccttctctctacagcaggetaacgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaa</p>	
12389gH 5 VH	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWVGTISSGGRTYYASWAKGRFT ISKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLTVTVSS</p>	39
12389gH 5 VH (nt.)	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgettgtcatgegcgggtgctccggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacagggccccggcaaagggctggagtgggtcggcaccatctcaa gcccggagggggacttactatgcctctctgggccaagggacgcttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttea atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc</p>	40
12389gH 5 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWVGTISSGGRTYYASWAKGRFT ISKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFEP</p>	41

	<p>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 5 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtcagctgggtcgaatcggggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggtggagtgggtcggcaccatctcaa gcggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaaccttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgactactgtggacggggagatggagccaccggttca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaagg cccatcgggttctccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcaag cggccctgggctgcctggtaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgc gtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccgggtgtccta cagtctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagcag cttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtagaaaaactcacaatgcc caccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccc ccaaaacecaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgctg tgggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtactg ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagt acaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcag</p>	<p>42</p>

[1104]

[1105]

	<p>cctgacctgcctggcctcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccaagcctcccgctgg actccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggetctgcaca ccaactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 5 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWVGTISSGGRTYYASWAKGRFT ISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	43
<p>12389gH 5 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggctegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgatgcgcgggtgctccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggeccctggcaaaagggtggagtgggtcgccaccatctcaa gcggagggcggaactactatgctctctgggccaagggaagcttaccatctc gaaggactcctegaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgetgagggca gaggacctgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgettctacaaaggg cccatcgttctcccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcacag ccgcccctgggctgctggcctcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactaggeccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctac agtctcaggacttactcctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcagc</p>	44

[1106]

	<p>ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aagggtggacaagagagttgagtccaaatatgggtcccccattgccaccatgcc cagcacctgagttctggggggaccatcagtcttctgttcccccaaaaccc aaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtggg acgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagegtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgtctccatcgaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtaaaaggettctaccccagegacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacgg ctcttcttctctacagcaggttaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgtctcgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	
12389gH 6 VH	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWISTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSS</p>	45
12389gH 6 VH (nt.)	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtgggtcgtgagccgggaggtccc tgcgettgtcatgcgcgggtgtccggcattgaccttagctccaagccatgagct gggtcagacagggccccctggcaaagggctggagtggattccaccatctcaag cggagggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttccaccatctcg aaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggcag aggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggttcaa tatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc</p>	46
12389gH 6 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWISTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG</p>	47

	<p>FNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ENSGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 6 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtgggtctgggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgceatgagct gggtcagacaggeccctggcaaagggtggagtgattccaccatctcaag cggaggcgggacttactatgcctctctgggccaaggagcgttcaccatctcg aaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggcag aggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctcaa tatctggggccagggaacctcgtgactgtctcagcgccttctacaaagggcc catcggttccccctggcaccctctccaagagcaccctctggggggcagcgcg gccctgggctgectggcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtg gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacag tctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcagctt gggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaa ggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc ccgtgcccagcactgaactctggggggaccgtcagcttctcttcccccc aaaaccaaggacacctcatgatctcccggacctgaggtcacatgctgtg gtgggtgacgtgagccaagaagacctgaggtcaagtcaactggtagctgg acggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtac aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccc</p>	<p>48</p>

[1107]

[1108]

	<p>catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg tftacacctgccccateccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcct gacctgectggtaaaaggcttctatcccagegacategcectggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtggac tccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc actacaacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 6 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWISTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</p>	49
<p>12389gH 6 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatcggggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgcgcgggtgctccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagccccctggcaaagggtggagtggatttccaccatctcaag cggagggcggacttactatgcctcctgggccaaggacgcttccaccatctcg aaggactcctegaagaacacgctgtacctccaaatgaactcgtgagggcag aggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttcaa tatctggggccagggaacctcgtgactgtctcgagcgttctcaaaagggcc catecgttctcccctgggeccctgtccaggagcacctccgagagcacagcc gccctgggctgctggtcaaggacttctcccgaaccgggtgacgggtgctgctg</p>	50

[1109]

	<p>gaactcaggcgcctgaccageggcgtgcacacctcccggctgtctacag tctcaggactctactcctcagcagcgtggtagcctgcccaccagcagctt gggcaagaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaa ggtggacaagagagttgagtccaaatattggteccccatgccaccatgccc gcacctgagttctggggggaccatcagttctgttcccccaaaacccaa ggacactctcatgatctcccggaccctgaggtaacgtgcgtgggtgggacg tgagccaggaagaccccagggtccagtccaactggtaactggatggcgtgga ggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgta ccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaecggcaag gagtacaagtcaaggctccaacaaaggcctcccgtctccatcgagaaaa ccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgc ccccatcccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggt caaaggettctaccccagegacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcc ttctctctacagcaggctaacctggacaagagcaggtggcaggaggggga atgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacag aagagcctctcctgtctctgggtaaa</p>	
<p>12389gH 8 VH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SRDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSS</p>	<p>51</p>
<p>12389gH 8 VH (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcattgcgcgggtgctcggcaattgaccttagctccaacgceatgagct gggtcagacaggccccggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggaggggcggacttactatgctctctgggccaagggacgcttcaccatctc gcgggactctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggca gaggacaactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttea atatctggggccagggaaccctcgtgactgtctcgagc</p>	<p>52</p>
<p>12389gH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS</p>	<p>53</p>

[1110]

<p>8 重链 (IgG1)</p>	<p>WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SRDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 8 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatcegggggtgggtcgtgcagecgggaggttccc tgcgcttgcatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggeccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gcggagggcggactactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gcgggactcctegaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaagg cccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcaag cgccctgggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgct gtggaactcaggcgcctgaccageggcgtgcaacacttccggctgtctca cagtctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcag cttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcc caccgtgeccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacctgaggtcacatgag tggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgt ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag</p>	<p>54</p>

[1111]

	<p>acaacagcaegtaccgtgtggtcagegtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaagaagcctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcag cctgacctgectggcacaaggcttctatcccagegacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccaagcctcccgtgtgg actccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaaa ccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 8 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISGGRTYYASWAKGRFTI SRDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNV D HKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>55</p>
<p>12389gH 8 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggctegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgettgtcatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaagccatgaget gggtcagacagggccccggcaaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggagggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttcaccatctc gcgggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgactactgtggacggggagatggagccaccggttea</p>	<p>56</p>

[1112]

	<p>atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcctcttccccctggcgccctgtccaggagcactccgagagcacag ccgcccctgggctgectggcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctac agtctcaggactctactcccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagc ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aagggtggacaagagagttgagtccaaatatggteccccatgccaccatgcc cagcacctgagttctggggggaccatcagtcttctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtggg acgtgagccaggaagaccccagggtccagtcaactggtaactggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagcctcccgtctccatcgaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg ctcttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgttctctcatgctcctgatgatgaggetctgcacaaccactacac acagaagagcctctcctgtctctgggtaaa</p>	
<p>12389gH 9 VH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGTLVTVSS</p>	<p>57</p>
<p>12389gH 9 VH (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtgggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgcgcgggtgtccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggcccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gcggaggggcggactactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggacaactcgaagaacacctgtacctccaaatgaaactcgtgagggc</p>	<p>58</p>

[1113]

	agaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttc aatatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc	
12389gH 9 重链 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	59
12389gH 9 重链 (IgG1) (nt.)	gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcattgcgcgggtgtccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gctggagggeggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggacaactcgaagaacacctgtacctccaaatgaactcctgagggc agaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttc aatatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaagg gcccacgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcactctgggggcaca gctggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccggtgacgggtgt cgtggaactcagggcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtct acagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagca gcttgggcaccagacctacatctgcaactgaaatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagaaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgc ccacctgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagttctctcttccc	60

[1114]

	<p>ccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgc gtgggtggtagctgagccacgaagaccctgaggtaagtcaactggtagc tggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcag tacaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccage ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagaaaccac aggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtagc cctgacctgctggtagcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccagcctcccgtgctgg actccgacggctctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtctctctatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca ccaactacagcagaagagcctctcctgtctcccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 9 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	61
<p>12389gH 9 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcctgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggagggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttaccatctc</p>	62

[1115]

	<p>gaaggacaactcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggc agaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggctt aatatctggggccagggaaccctcgtgactgtctcgagecgttctacaaagg gcccatecgttctccccctggcgccctgtccaggagcacctccgagagcaca gccgccctgggctgectggcaaggactactceccgaaccggtgacgggtgc gtggaactcagggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggtgtccta cagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcag cttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagagagttgagtccaataatggtecccccattgccaccatgc ccagcacctgagttctggggggaccatcagtttctgttccccccaaaacc caaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgectgggtgg acgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgtctctccatcgaga aaaccatctccaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgecccccattcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtaaaaggcttctaccccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg ctctcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgttctctcatgctcctgatgatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	
<p>12389gH 11 VH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSS</p>	<p>63</p>
<p>12389gH 11 VH</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcctgcgcgggtgtccggcattgaccttagctccaacgcatgagct</p>	<p>64</p>

[1116]

<p>(nt.)</p>	<p>gggtcagacaggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcgaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggactcctegaagaacacctgtacctccaaatgaactcgctgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggettea atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagc</p>	
<p>12389gH 11 重链 (IgG1)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>65</p>
<p>12389gH 11 重链 (IgG1) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggctgaatccgggggtggctcgtggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcctatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcgaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggactcctegaagaacacctgtacctccaaatgaactcgctgagggca gaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggettea atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgettetacaaaggg cccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcactctgggggcaag cggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctc gtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctca</p>	<p>66</p>

[1117]

	<p>cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtagcgtgccctccagcag ctfgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagcccaatcttgtagacaaaactcacacatgcc cacgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatggg tggtggtagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtagct ggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccaggagcagct acaacagcacgtaccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcag cctgacctgctggtaaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtg agagcaatgggcagccggagaaactacaagaccagcctcccgctgctgg actccgacggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaagctctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaa ccactacagcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 11 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>67</p>

[1118]

<p>12389gH 11 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgccttgatgcgcgggtgctccggcattgaccttagctccaacgceatgagct gggtcagacaggccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggactcctcgaagaacacctgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacctgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggttca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcctcttccccctgggcctctgctccaggagcactccgagagcacag ccgccccgggtgctctggcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcagggccttgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctac agtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagc ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtcacaatatggteccccatgcccaccatgcc cagcacctgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacctgctggtggtgg acctgagccaggaagaccccagggtccagtcaactggtacctggatggcgt ggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtcaaggtctccaacaaggcctcccgtctctccatcgaga aaacctctcaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgct ggtcaaaggcttctaccccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacgg ctcttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtctctcatgtctcctgatgatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	<p>68</p>
<p>12389gH 12 VH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG</p>	<p>69</p>

[1119]

	FNIWGQGTLVTVSS	
12389gH 12 VH (nt.)	gaagtcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgecggtgtccggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gCGGAGGGEGGACTTACTATGCCTCCTGGGCCAAGGGACGCTTCAACCATCTC gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtgCGCGGGGAGATGGAGCCACCGGCTTCA atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc	70
12389gH 12 重链 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG FNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	71
12389gH 12 重链 (IgG1) (nt.)	gaagtcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgecggtgtccggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gCGGAGGGEGGACTTACTATGCCTCCTGGGCCAAGGGACGCTTCAACCATCTC gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtgCGCGGGGAGATGGAGCCACCGGCTTCA atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcggttctcccctggcaccctcctccaagagcactctgggggcaag	72

[1120]

	<p> cggccctgggctgcctggcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgc gtggaactcaggegcctgaccageggcgtgcacacctcccggctgtccta cagtcctcaggactctactcctcagcagecgtggtgaccgtgccctccagcag cttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtagacaaaactcacacatgcc caccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccc ccaaaaccecaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgcg tgggtggtagcgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtagct ggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt acaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtcctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcag cctgacctgcctggtaaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctgg actccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgatgaggetctgcacaa ccaactacagcagaagagcctctcctgtctcccgggtaaa </p>	
<p> 12389gH 12 重链 (IgG4P) </p>	<p> EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG FNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG </p>	<p>73</p>

	<p>QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</p>	
<p>12389gH 12 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgatgcgcgggtgctcggcattgaccttagctccaacgceatgagct gggtcagacaggccccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctctctgggccaagggaaccttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgactactgtgcgcggggagatggagccaccggcttca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatccttccccctgggcacctgtccaggagacctccgagagcacag ccgccctgggctgectggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcttac agctctcaggacttactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagc ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtccaaatatgggtcccccatgcccaccatgcc cagcacctgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtggg acgtgagccaggaagaccccagggtccagtcaactgggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtcaaggtctccaaacaaggcctcccgtctctccatcgaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgcacctcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgct ggtaaaaggcttctaccccagcagatcggcgtggagtgggagagcaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacgg ctcttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgttctctcatgctcctgatgatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	<p>74</p>
<p>12389gH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS</p>	<p>75</p>

[1121]

13 VH	<p>WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGTLVTVSS</p>	
12389gH 13 VH (nt.)	<p>gaagtcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgegeggcttcggcattgaccttagctccaagccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gctggagggeggacttactatgctctctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggacaactcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggc agaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttc aatatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagc</p>	76
12389gH 13 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	77
12389gH 13 重链 (IgG1) (nt.)	<p>gaagtcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgegeggcttcggcattgaccttagctccaagccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gctggagggeggacttactatgctctctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggacaactcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggc agaggacactgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttc</p>	78

[1122]

[1123]

	<p>aatatctggggccagggaacctctgtgactgtctcgagecgttctacaaagg gcccategggttccccctggcaacctctccaagagcacctctgggggcaca gcggccctgggctgectggtaaggactacttcccgaaccggtgacgggtg cgtggaactcaggeccctgaccageggcgtgcaacaccttcccggctgtct acagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagca gcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtaaaaaactcacacatgc ccaccgtgccagcacctgaactctggggggaccgtcagtcttctcttccc cccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgc gtgggtggtagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacg tggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctcccage ccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagetgaccaagaaccaggtcag cctgacctgcctggtaaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgtgg actccgacggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgttctctcatgtctcctgatgatgaggetctgcacaa ccactacagcagaagagcctctcctgtctcccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 13 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD</p>	<p>79</p>

	<p>WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	
<p>12389gH 13 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgcttgcatgcgcggcttcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggacaactcgaagaacacctgtacctccaatgaactcctgaggggc agaggacctgctgtgtactactgtggacggggagatggagccaccggcttc aatatctggggccagggaacctcgtgactgtctcagagccttctacaaagg gcccacctcttccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcaca gccgccctgggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgct gtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagctctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagcag cttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagagagttgagtcctcaaatatgggtcccccatgccaccatgc ccagcactgagttcttggggggacctcagcttctctgttcccccaaaacc caaggacaactctcatgatctcccggaccctgaggtcactgctgctggtggtg acgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgtctctccatcgaga aaacctctcaaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgct ggtcaaaggcttctaccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccacgctcctcctgctggactccgacgg ctcttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgttctctcatgctcctgatgcatgaggtctgcacaaccactacac</p>	<p>80</p>

[1124]

[1125]

	acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	
12389gH 14 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG FNIWGQGLTVTVSS	81
12389gH 14 VH (nt.)	gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcacatgcgcggcttcggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gctggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgaggggca gaggactcgtgtgtactactgtgcgcggggagatggagccaccggcttca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgcgc	82
12389gH 14 重链 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG FNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	83
12389gH 14 重链 (IgG1) (nt.)	gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcacatgcgcggcttcggcattgaccttagctccaacgccatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gctggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc	84

[1126]

	<p>gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggca gaggacactgctgtgtactactgtgcgcggggagatggagccaccggctca atatctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcgggttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcaag cggccctgggctgcctggtaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgc gtggaactcagggcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcag cttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcc caccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgcg tggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtaagtcaactggtactgt ggacggcgtggagggtgataatgccaagacaagcgcggggaggagcagt acaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccctcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcag cctgacctgcctggtaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagcgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgtgtg actcgcagggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgtcctgatgatgaggetctgcacaa ccactacagcagaagagcctctcctgtctcgggtaaa</p>	
<p>12389gH 14 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRYYASWAKGRFTI SKDSSKNTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGATG FNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP</p>	<p>85</p>

	<p>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	
<p>12389gH 14 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaaatccgggggtgggtctgggtgcagccgggagggtccc tgcgcttgatgcgcggcttcggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacaggccctggcaaagggtggagtggattggcaccatctcaa gaggaggggcggacttactatgcctcctgggccaagggaagcttaccatctc gaaggactcctcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgetgagggca gaggacactgctgtgtactactgtgcgcggggagatggagccaccggcttca atatctggggccaggaaccctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggg cccatcgtcttccccctgggcacctgctccaggagcactccgagagcacag ccgccctgggctgectggcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcttac agctctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcagc ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtccaaatatggteccccatgcccaccatgcc cagcactgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctccggaccctgaggtaactgctgctgggtgg acgtgagccaggaagaccccgagggtccagtcaactggtaactggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtacctgtgggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtgaaggtctccaaacaaggcctccgctctccatcgaga aaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtaagcctgacctgct ggtcaaaggcttctaccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagcgggagaacaactacaagaccacgctcctccgtgctggactccgacgg</p>	<p>86</p>

[1127]

	ctccttcttctctacagcaggctaacctggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgtctcctgatgatgaggtctgcacaaccactacac acagaagagcctctcctgtctctgggtaaa	
12389gH 15 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSS	87
12389gH 15 VH (nt.)	gaagtgcagctggctcagctcgggtggaggcctggctcagcctggcggctccc tgcggctgtctcgcgccgtctcgggatcagctgtcctccaacgctatgagct gggtcagacaggcaccgggaaggtctggagtggatcgggacaatctcca gcgggcgccgcactactacgcatcctgggccaaggaaggttcaccatttc gaaggacaactccaagaacacgctgtacctcagatgaactcctgcgggccc gaggatactgcccgtgtattactgtgcgaggggagatggcgcgactgggttca acatctggggacagggaaacgctgggtgactgtgtctctcg	88
[1128] 12389gH 15 重链 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	89
12389gH 15 重链	gaagtgcagctggctcagctcgggtggaggcctggctcagcctggcggctccc tgcggctgtctcgcgccgtctcgggatcagctgtcctccaacgctatgagct	90

[1129]

<p>(IgG1) (nt.)</p>	<p>gggtcagacaggcaccgggaagggtctggagtggatcgggacaatctcca gggcggccgcacctactacgcacatctgggccaaggaagggtcaccatttc gaaggacaactccaagaacaccgtgtaccttcagatgaactccctgcccggcc gaggatactgccgtgtattactgtgaggggagatggcgcgactgggttca acatctggggacaggaacgctggtgactgtgtcctcggcttcgaccaaggg gccctcgggttccctctggecctagctccaagagcacttcaggcggaaagg ctgccctcggatgcctggtaaggactacttcccagagcccgtagccgtgtca tggaaacagcggagctctgactagcggagtgcacaccttccggcggtgtgc aaagctcaggcctgtactcgtctcctcagtggtcaactgtcccgctcctcctcgt ggggactcaaacgtacatctgcaacgtcaatcacaaccgtcaaatacaaa gtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgtgcgataagaccacacctgtccgc catgcccagccccgaactgctgggaggaccaagcgtgttctcttcccggcca aaacaaaagacaccttgatgattcacggactctgaggtcactgctgctgct ggtggacgtgagccatgaggaccagaagtgaattcaattggtacgtggac ggagtccaagtgcataacgccaagaccaagcccagagaggaacagtataa cagcacctaccgggtcgtgagcgtgctcactgtgttgaccaggactggctca atggaaaggagtacaagtgcaagtgtccaataagggcctcctcctgctccat cgaaaagaccatcagcaaggcaaggccagccacgcgaaccgcaagtgt acacccttcgcgctcgcgcatgaaactgactaaaaaccaagtctcgtgac ctgtctcgtgaagggtttaccctcggacattgcggtggagtgggagtcga acggtcagccggaaaacaattacaagaccactcgcgggtgctcgcactcgg atgggtccttctcctcactcgaagttgaccgtcgataagtccagatggcagc agggtaacgtgttctcgtgcagcgtgatgcagagccctgcacaaccatta cactcagaagtegttctccttgcaccgggcaa</p>	
<p>12389gH 15 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES</p>	<p>91</p>

	<p>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	
<p>12389gH 15 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggctgagtcceggaggcctggcagcccggeggctccc tgcggctgtctgcgccgtctccgggatcgacctgtcctccaacgctatgagct gggtcagacaggcaccgggaagggtctggagtggatcgggacaatctcca gcggcgccgcacctactacgcctctgggccaagggaaggttcaccatttc gaaggacaactccaagaacacctgtacctcagatgaactcctgcgggccc gaggatactgccgtgtattactgtgcgaggggagatggcgcgactgggttca acatctggggacagggaacgtgggtgactgtgtcctcggcttctacaaaggg cccatcctgttccccctgggeccctgtccaggagcaccctcgagagcacag ccgccctgggctgectggcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcaggegcctgaccagcggegtgcacacctcccggctgtcttac agtctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgacctgccctccagcagc ttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacc aaggtggacaagagagttgagtccaaatattggteccccatgccaccatgcc cagcaactgagttctggggggaccatcagtcttctgttccccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcactgctgctgggtgg acctgagccaggaagaccccagggtccagttcaactggtaactggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaagcccgaggaggagcagttcaacagca cgtacctgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtcaaggtctccaacaaggcctcccgtctccatcgaga aaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacccc</p>	<p>92</p>

[1130]

[1131]

	<p>tgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgect ggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactcgcagcg ctcttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgtctcgtgatgcatgaggetctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	
12389gH 16 VH	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSS</p>	93
12389gH 16 VH (nt.)	<p>gaagtgcagctggctcgagtcgggtggaggcctgggtgcagcccggcgctccc tgcggctgtctctgcgccctcgggatcgacctgtctccaacgetatgagc tgggtcagacaggcacccgggaagggtctggagtggatcgggacaatctcc agcggcgccgcacctactacgcatacctgggccaagggaagggttcaccattt cgaaggacaactccaagaacaccgtgtaccttcagatgaactcctgcgggc cgaggatactgccgtgtattactgtgcgaggggagatggcgcgactgggttc aacatctggggacagggaacgetggtgactgtgtctctcg</p>	94
12389gH 16 重链 (IgG1)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS</p>	95

[1132]

	RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
12389gH 16 重链 (IgG1) (nt.)	gaagtgcagctggctgagtcgggtggaggcctgggtgcagcccggeggctccc tgcggctgtctgcgccgcctcgggatcgacctgtcctccaacgctatgagc tgggtcagacaggcaccgggaagggtctggagtggatcgggacaatctcc agcggcggecgcaactactacgcatactgggccaagggaagggtcaccattt cgaaggacaactccaagaacaccgtgtacctcagatgaactcctgcggggc cgaggatactgacctgtattactgtgcgaggggagatggcgcgactgggttc aacatctggggacagggaacgctggtagctgtgtcctcggcttcgaccaagg ggccctcgggtgtccctctggegcctagctccaagagcaactcaggeggaaag gctgccctcggatgacctggtaaggactactcccagagcccgtgacctgtc atggaacagcggagctctgactagcggagtgcacaccttccggcgggtgctg caaagctcaggcctgtactcgtctctcagtggtcactgtcccgtcctctcg ctggggactcaaacgtacatctgcaacgtcaatcacaaccgtcaatacca aagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgtgcgataagaccacacctgtcc gccatgcccagcccctgaactgctgggaggaccaagcgtgttctcttcccgc caaaacaaaagacaccttgatgattcacggactcctgagggtcactgcgt cgtggtggactgagccatgaggaccagaagtgaattcaattggtactgtg gacggagtgaagtgcataacgcccaagaccaagcccagagaggaacagta taacagcaactaccgggtcgtgagcgtgtcactgtgttgcaccaggactgpc tcaatggaaaggagtacaagtgcaaagtgtccaataaggccctcctgtccc catgaaaagaccatcagcaaggcaaggccagccacgcgaaccgcaag tgtacaccttccgcgctcgcgatgaactgactaaaaaccaagtctcgtg acctgtctcgtgaagggtttaccctcgcacattgcggtggagtgggagtc gaacggtcagccgaaaacaattacaagaccactccgcgggtgctcgactc ggatgggtccttctctctactcgaagtggaccgtcgataagtcagatggca gcagggtaacgtgttctcgtgcagcgtgatgcagaggccctgcacaacct tacactcagaagtcgttcttctgtcaccgggcaaa	96
12389gH 16 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISGGRITYYASWAKGRFTI	97

<p>(IgG1 LALA)</p>	<p>SKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>12389gH 16 重链 (IgG1 LALA) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctgggtcgaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcctgcgcggcttcggcattgaccttagctccaagccatgagct gggtcagacagccctggcaaagggtgagtgattggcaccatctcaa gctggagggggacttactatgcctcctgggccaagggaacctcaccatctc gaaggacaactcgaagaacacctgtacctccaaatgaactcctgagggc agaggacactgctgtgactactgtgcgcggggagatggagccaccggttc aatatctggggccagggaacctcgtgactgtctcgagcgttctacaagg gcccacgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcaca gctggccctgggctgctgtgcaaggactactccccgaacctgtgacggtgtc gtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctcta cagtcctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacctgacctccagcag cttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc aaggctgataagaaagtgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcc caccgtgccagcactgaagctgctgggggacctcagcttctcttctccc ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacctgaggtcacatgctg tggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgt ggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagt acaacagcagctacctgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactg</p>	<p>98</p>

[1133]

[1134]

	<p>gctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggatatccaacaaagccctcccage ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggatgagetgaccaagaaccaggtcag cctgacctgectggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgg actccgacggctccttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca ccaactacagcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa</p>	
<p>12389gH 16 重链 (IgG4P)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>99</p>
<p>12389gH 16 重链 (IgG4P) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggctegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggtccc tgcgettgtcatgecggettccggcattgaccttagctccaagccatgaget gggtcagacaggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gcggagggcggacttactatgectctgggccaagggacgcttcaccatctc gaaggacaactcgaagaacaccgtgtacctccaatgaactcgtgagggc agaggacaactgctgtgtactactgtgcgcggggagatggagccaccggett aatctctggggccagggaaacctcgtgactgtctcgagegettctacaagg gccatccttctcccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcaca</p>	<p>100</p>

[1135]

	<p>gcccctgggctgectggcaaggactactcecegaaccggtgacggtgc gtggaactcaggegcctgaccageggcggtgcacacttccggctgtccta cagtcctcaggactctactcectcagcagcggtgaccgtgccctccagcag cttgggcacgaagacctacactgcaacgtagatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagagagttgagtccaaatatggteccccatgccaccatgc ccagcacctgagttctggggggaccatcagttctctgttcccccaaac caaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcactgctgctgggtgg acgtgagccaggaagaccccagggtccagtcaactggtactggtggcgt ggaggtgcataatgccaaagacaagccgcccggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggc aaggagtacaagtcaaggtctccaacaaggcctcccgtctctccatcgaga aaacctctccaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc tgeccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgct ggtcaaaggcttctaccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacgg ctctcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtctctcatgctcctgatgatgaggetctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	
<p>12389gH 16 重链 (IgG4P FALA)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSNAMS WVRQAPGKGLEWIGTISSGGRTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDGAT GFNIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</p>	<p>101</p>

	<p>WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	
<p>12389gH 16 重链 (IgG4P FALA) (nt.)</p>	<p>gaagtgcagctggtegaatccgggggtggtctggtgcagccgggaggttccc tgcgcttgcatgecggettccggcattgaccttagctccaacgcatgagct gggtcagacagggccctggcaaagggctggagtggattggcaccatctcaa gggaggggggacttactatgcctctgggccaagggacgcttaccatctc gaaggacaactcgaagaacaccgtgtacctccaaatgaactcgtgagggc agaggacactgctgtgtactactgtgcgcggggagatggagccaccggttc aatatctggggccagggaacctcgtgactgtctcagcgttctacaaagg gcccatecgttctccccctggcgccctgtccaggagcacctccgagagcaca gccgacctgggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtc gtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtctcaggacttactcctcagcagcgtgggtgacctgacctccagcag cttgggcacgaagacctcacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaac caaggtggacaagagagttgagtccaaatatgggtccccatgcccaccatgc ccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagcttctgttccccccaaaac ccaaggacaactctcatgatctcccggacctgaggtcacgtgcgtgggtggtg gacgtgagccaggaagacctcagggtccagttcaactggtacgtggatggc gtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacag cacgtacctgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacg gcaaggagtacaagtgaaggtctccaaacaagacctccgctctccatcga gaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtaca ccctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa tgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgctgctggactccga cggctccttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcag gaggggaatgttctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccacta cacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa</p>	<p>102</p>
人	<p>AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWY</p>	<p>103</p>

[1136]

[1137]

<p>IGKV1D -13 IGKJ4 受 体框架</p>	<p>QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGGTKVEIK</p>	
<p>人 IGKV1D -13 IGKJ4 受 体 框 架 (nt.)</p>	<p>gccatccagttgaccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gtcaccatacctgcccgggcaagtcagggcattagcagtgcttagcctggta tcagcagaaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccagtt tggaaagtgggggccatcaaggttcagcggcagtggtctgggacagattt cactcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtca acagtttaatagttaccctcctcactttcggcggagggaaccaaggtggagatca aa</p>	<p>104</p>
<p>人 IGHV3-6 6 IGHJ4 受体框架</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMS WVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYW GQGLVTVSS</p>	<p>105</p>
<p>人 IGHV3-6 6 IGHJ4 受体框架 (nt.)</p>	<p>gaggtgcagctgggtggagtctgggggaggcttggtccagcctggggggtccc tgagactctctgtgcagcctctggattcaccgtagtagcaactacatgagct gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagttattatag cgggtgtagcacatactacgcagactcctgaagggcagattcaccatctcc agagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaacagcctgagagccg aggacaeggctgtgtattactgtgcgagatactttgactactggggccaagga accctggcaccgtctctca</p>	<p>106</p>

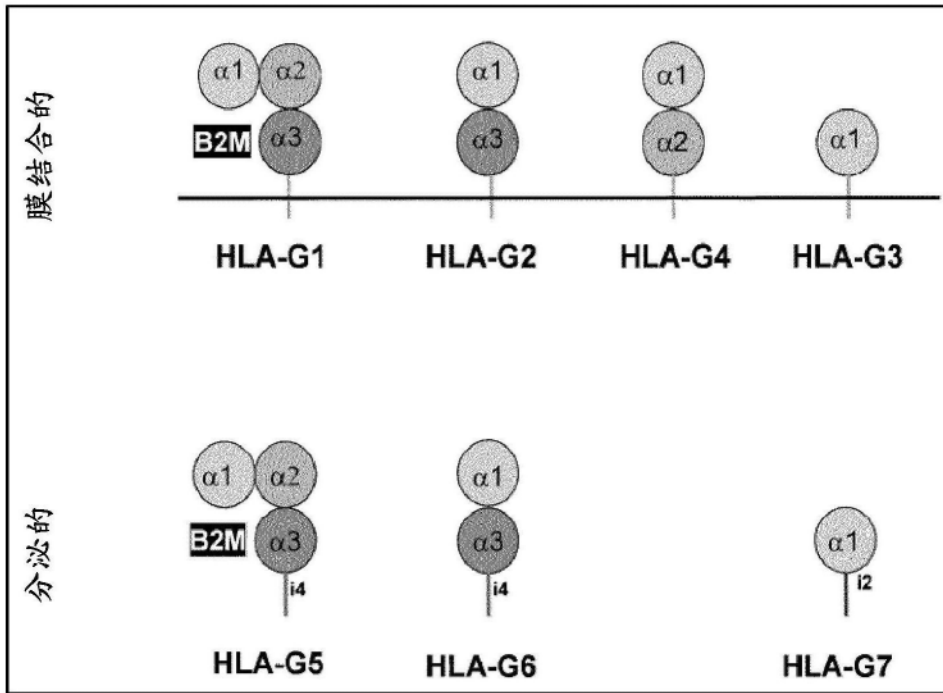


图1

```

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110
轻链 12389 ALVMTQFPASVSEPVGGTVTIKCOASQSIYSYLSWYQQKPGQPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDLECGDAATYYCONHWVGGNGWPFGGGTEVVVK
IGKV1D-13 AIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFPSSGSGTDFTLTISLQPEDDFATYYCOQFNSTYP--LTFGGGTKVEIK
12389gL1 AIWLFQSPSSLSASVGDVRVITCOASQSIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFPSSGSGTQFTLTISLQPEDDFATYYCONHWVGGNGWPFGGGTKVEIK
12389gL2 AIWLFQSPSSLSASVGDVRVITCOASQSIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFPSSGSGTDFTLTISLQPEDDFATYYCONHWVGGNGWPFGGGTKVEIK
12389gL3 AIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCRASQSIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFPSSGSGTDFTLTISLQPEDDFATYYCONHWVGGNGWPFGGGTKVEIK

```

图2

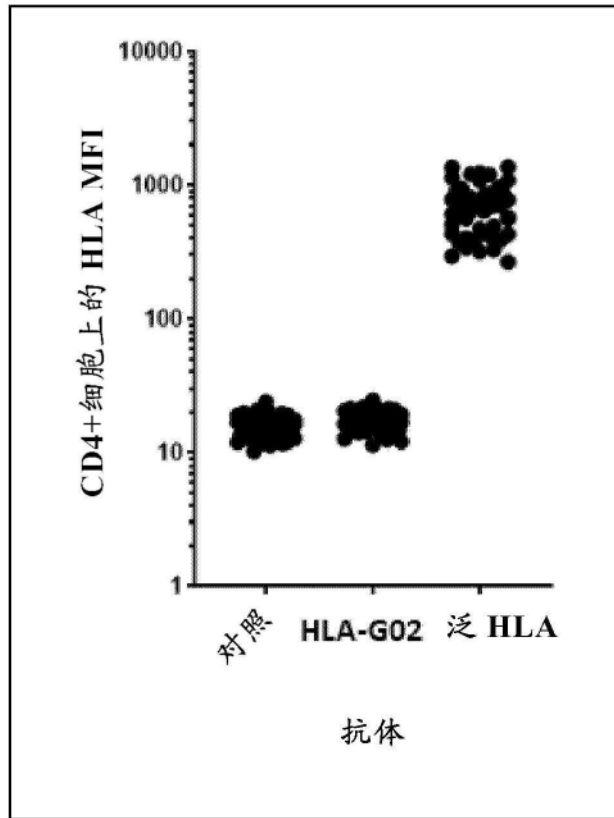


图4

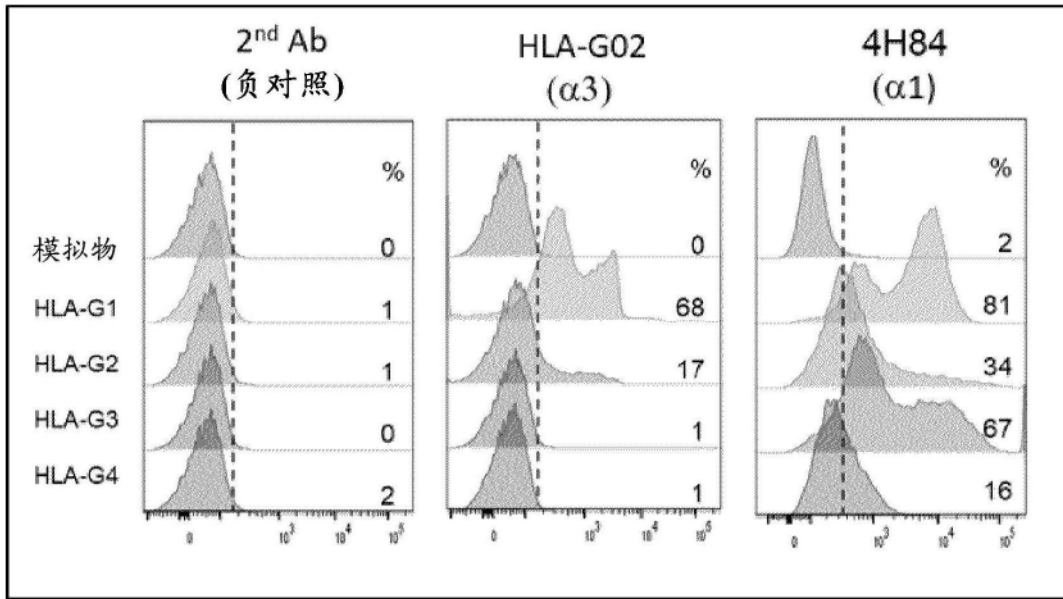


图 5A

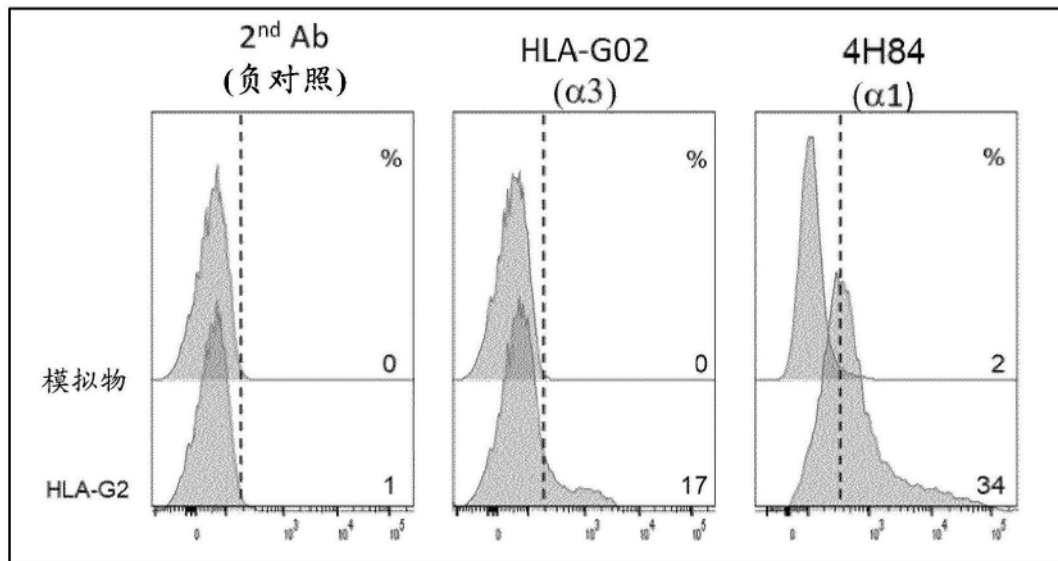


图 5B

图5

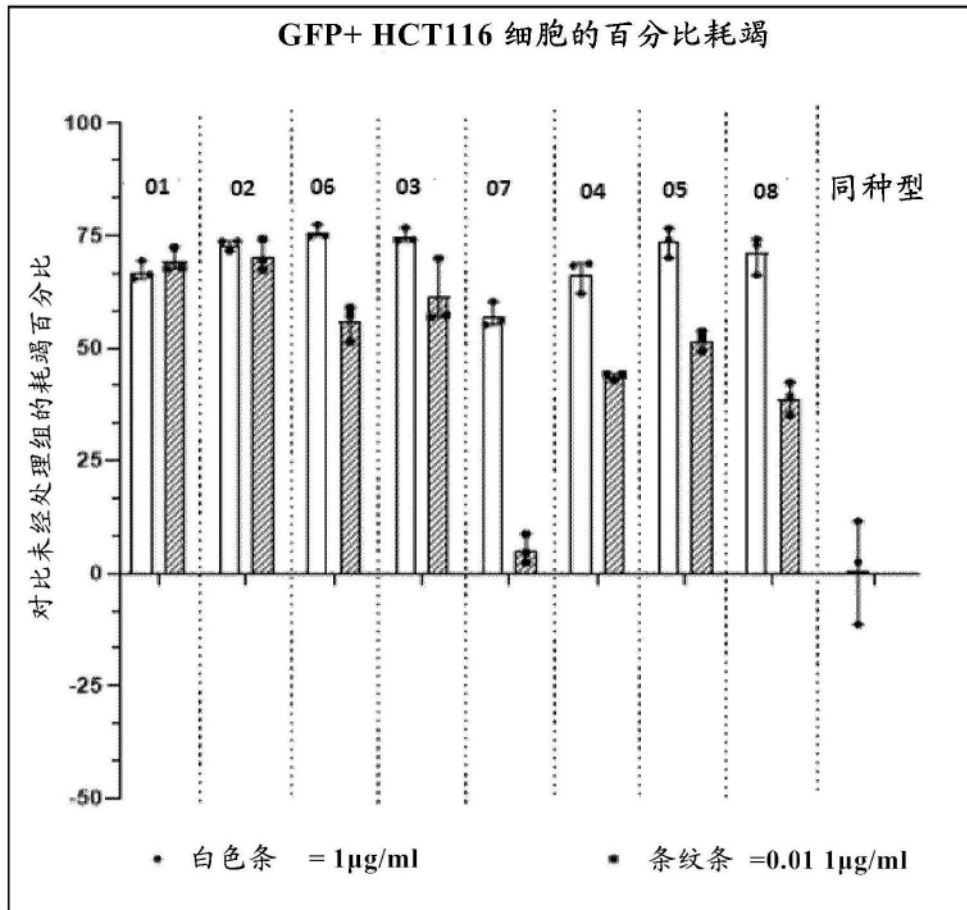


图6

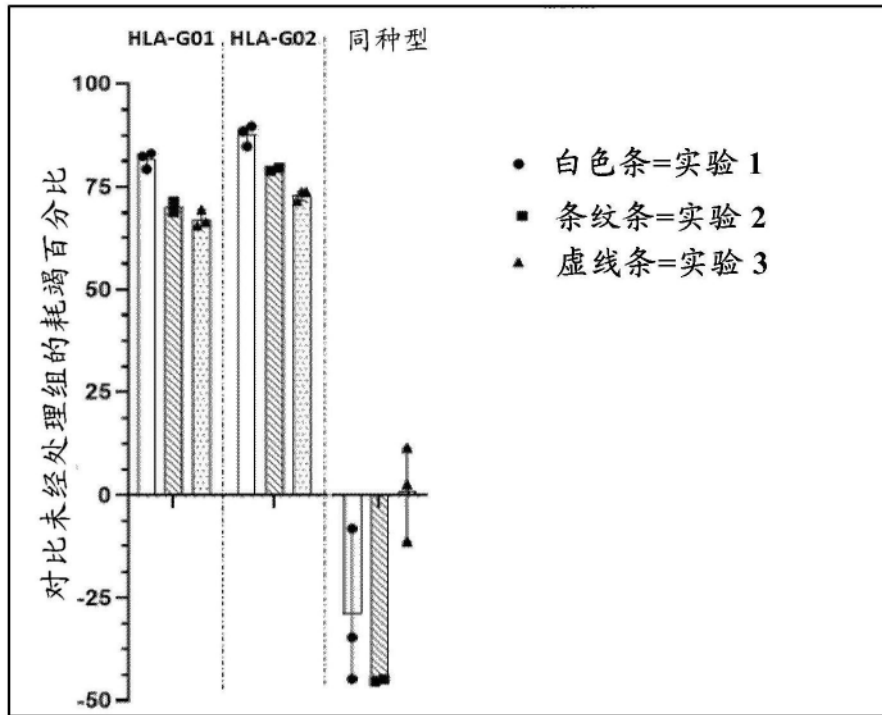


图 7A

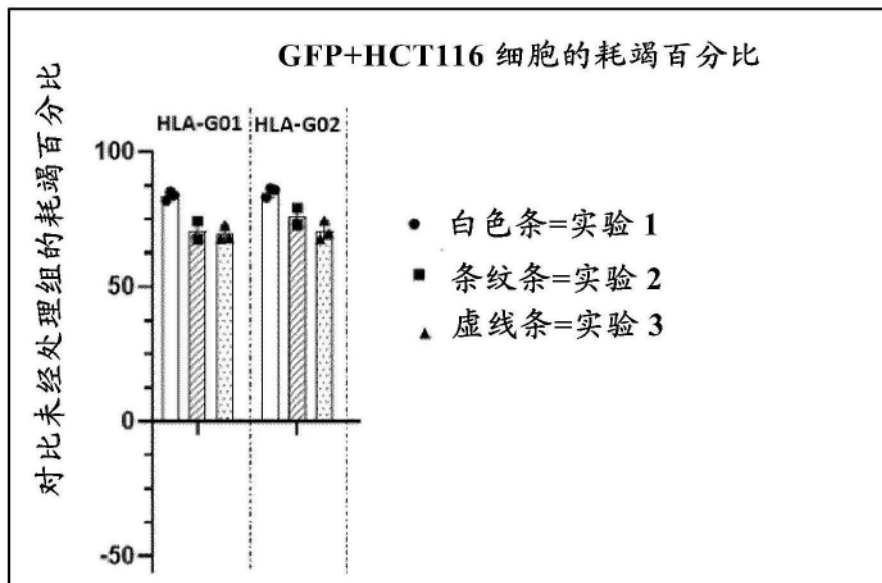


图 7B

图7

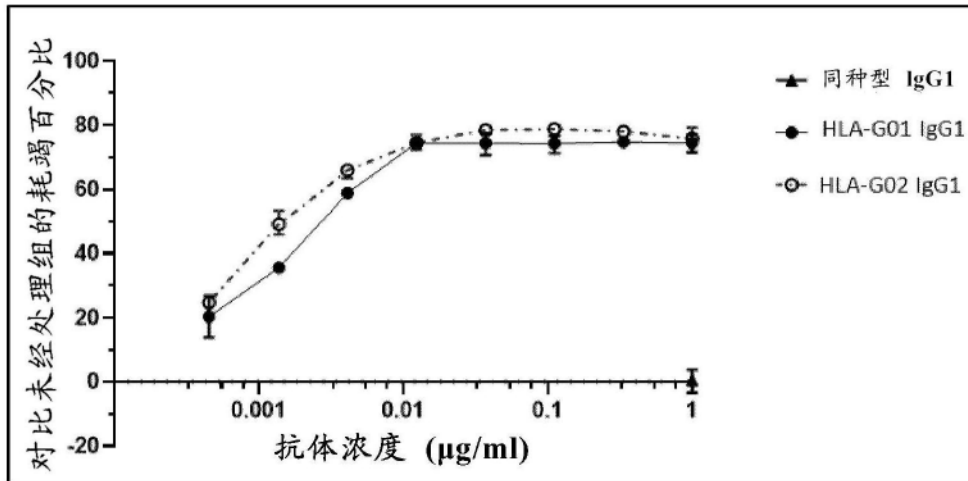


图8

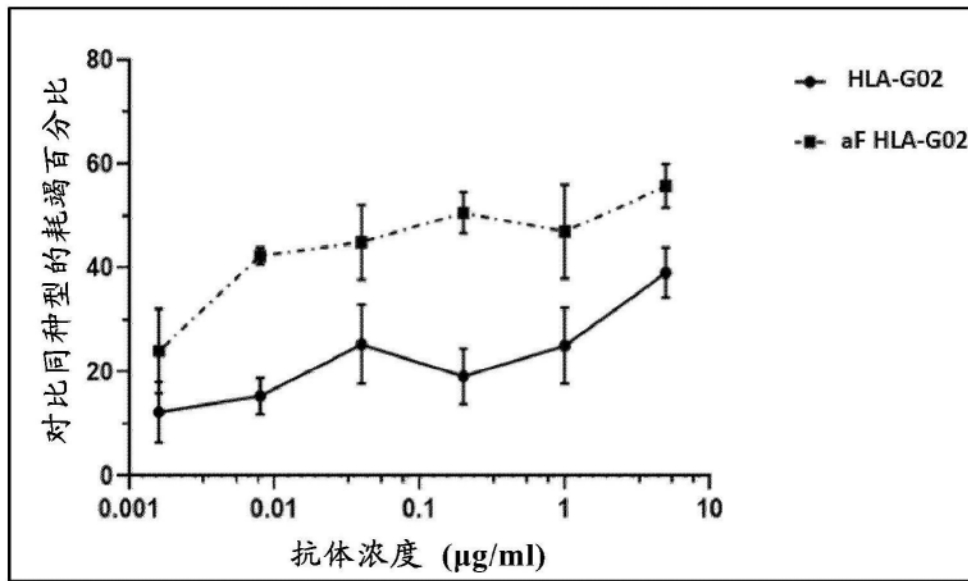


图 9A

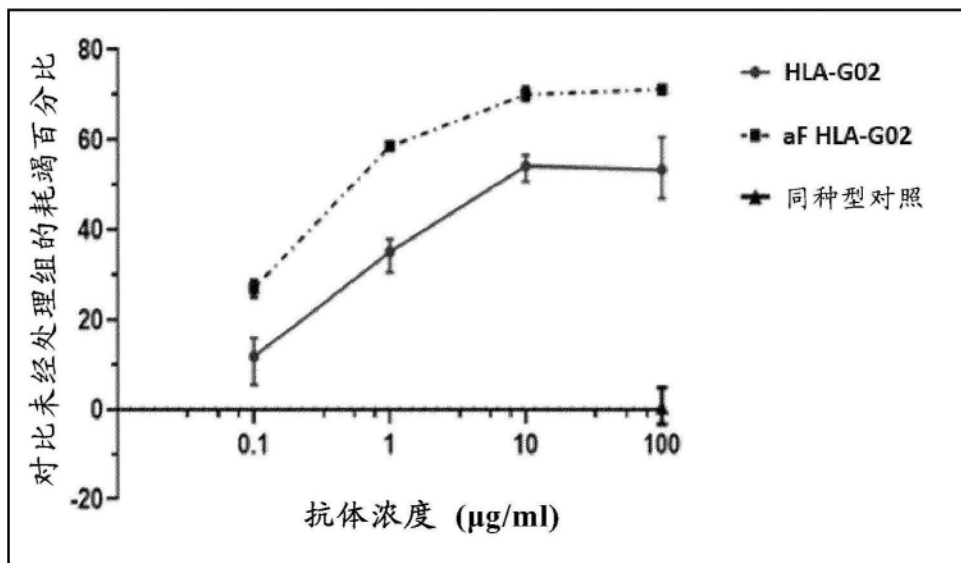


图 9B

图9

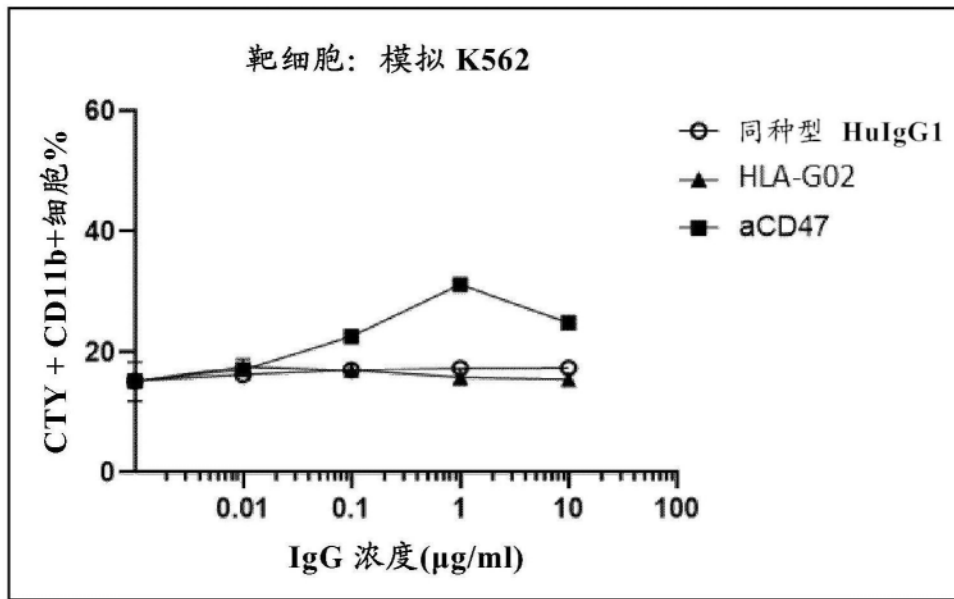


图 10A

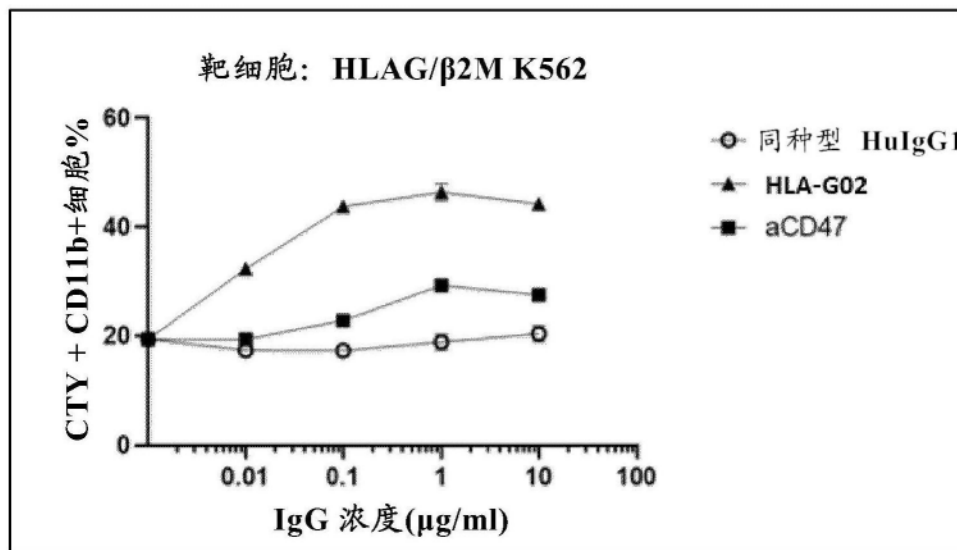


图 10B

图10

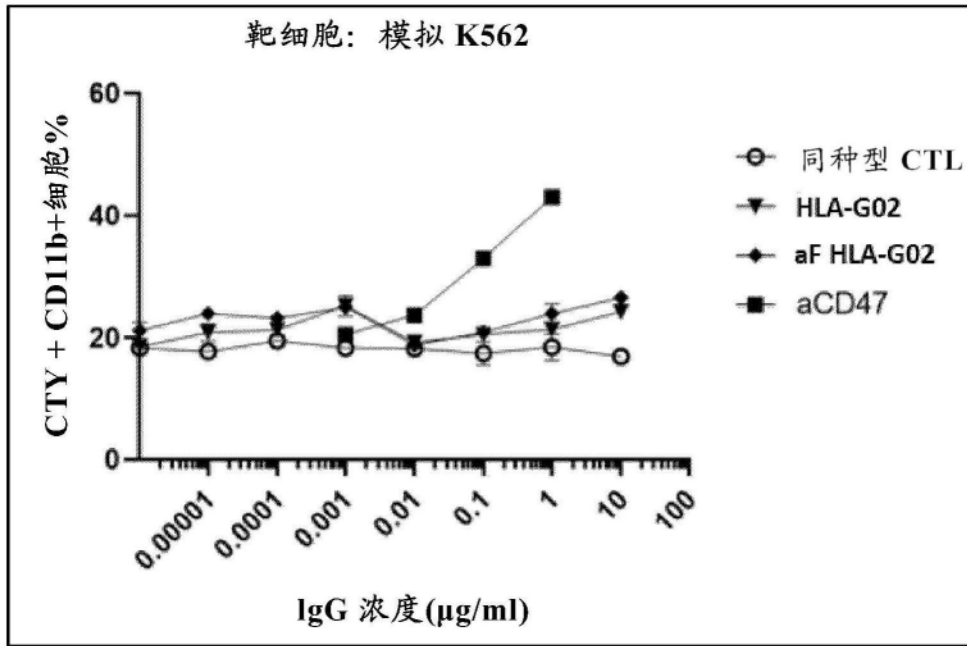


图 11A

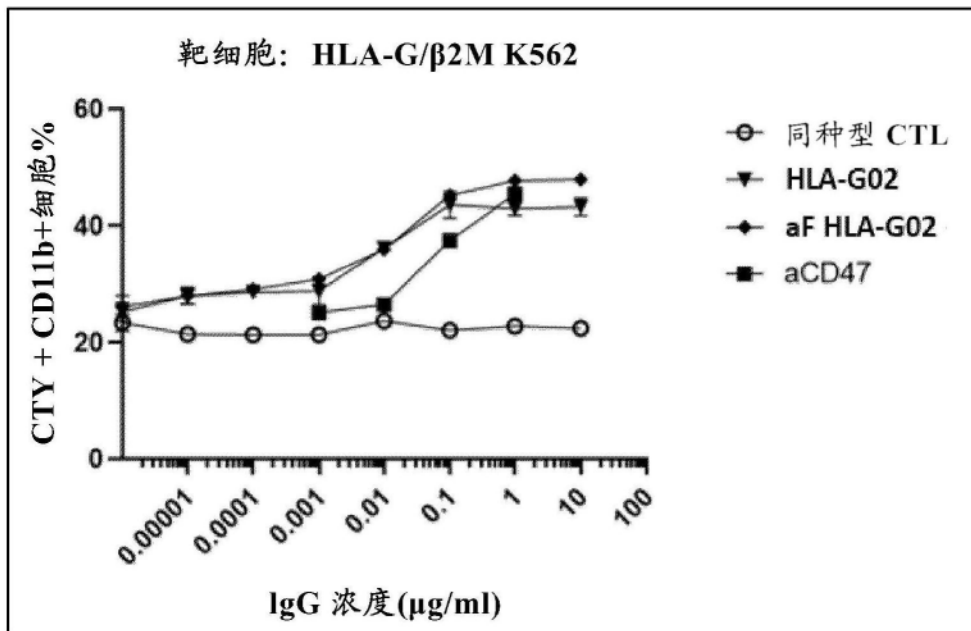


图 11B

图11

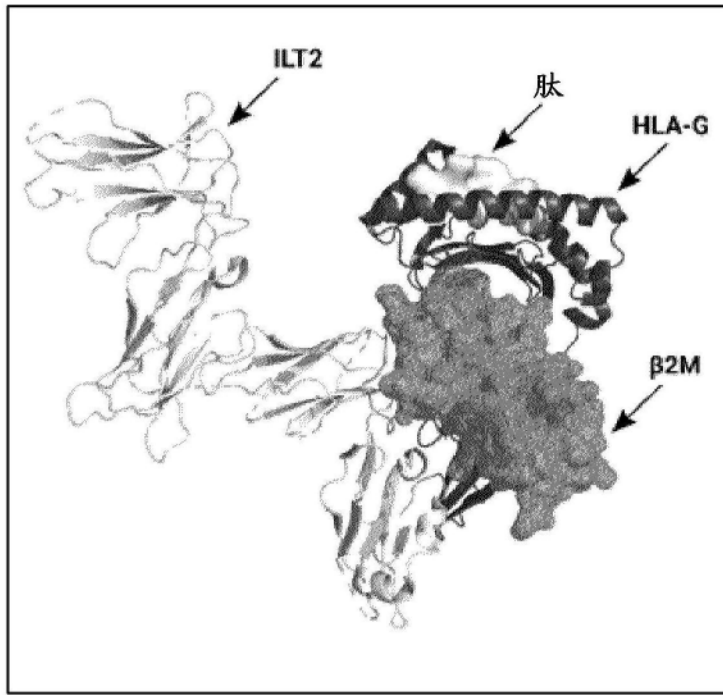


图 12A

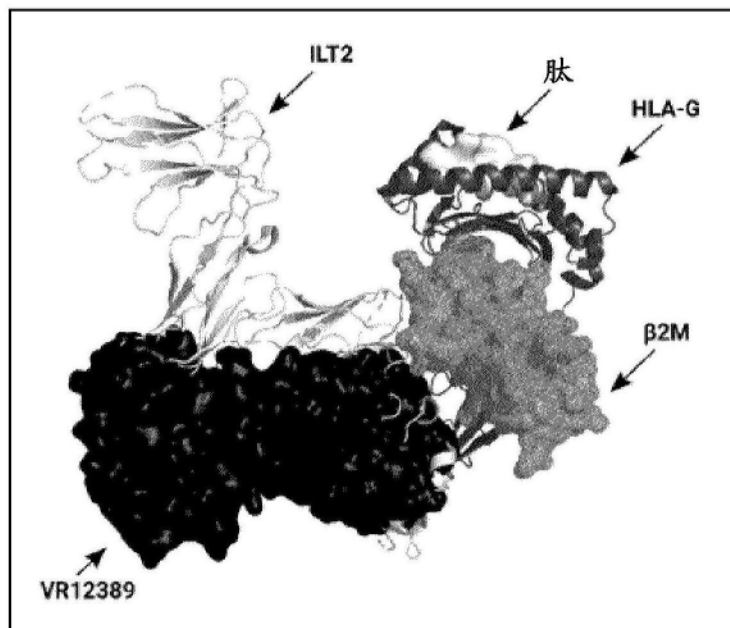


图 12B

图12

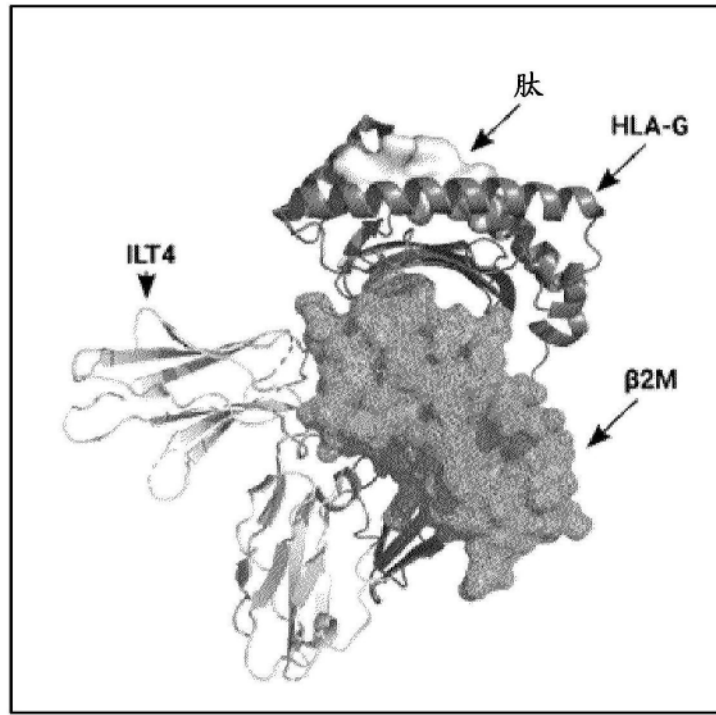


图 12C

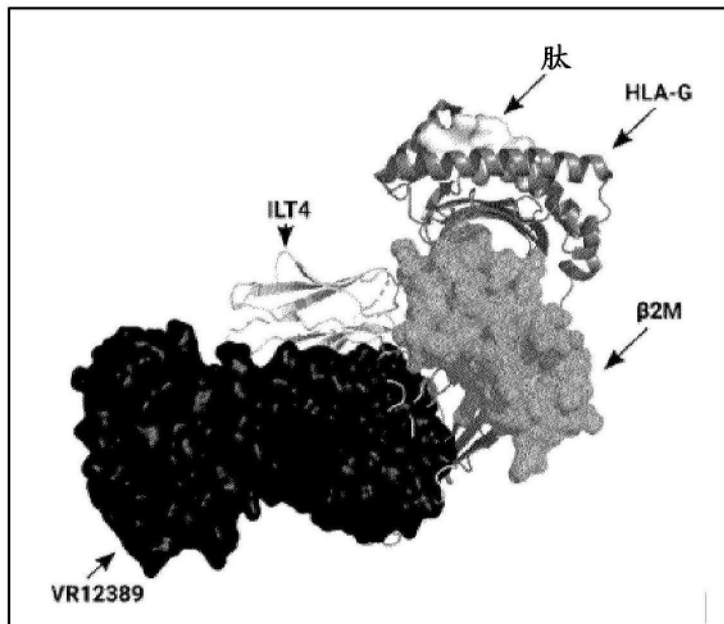


图 12D

图12续

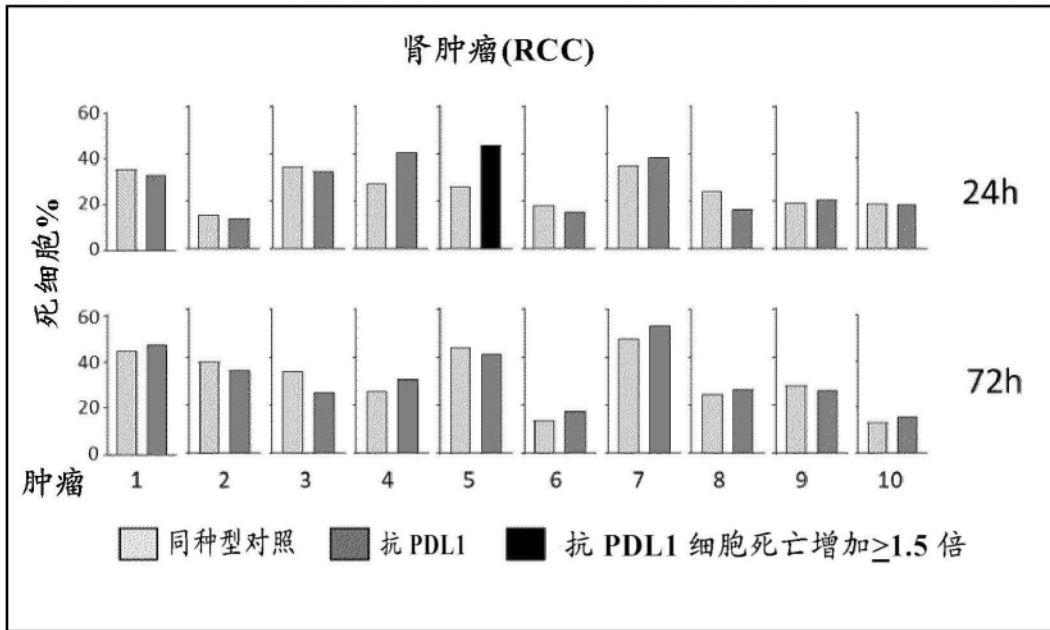


图 13A

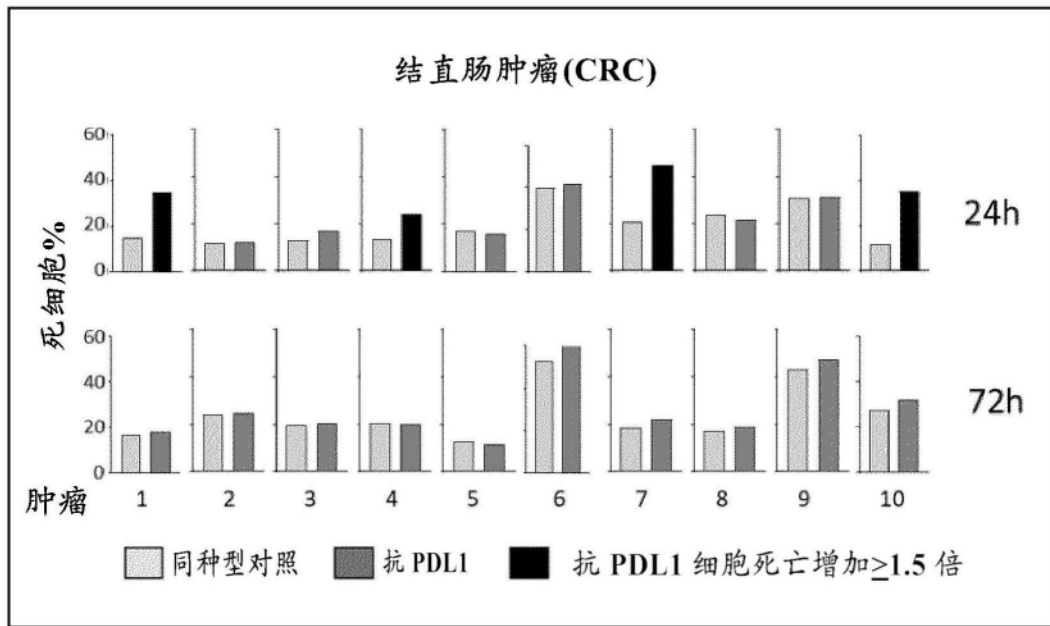


图 13B

图13

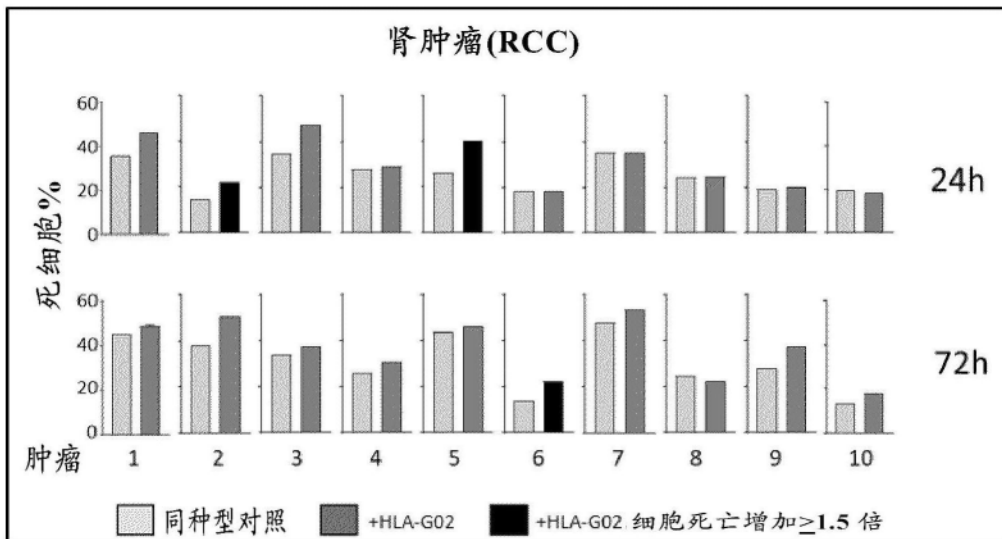


图 13C

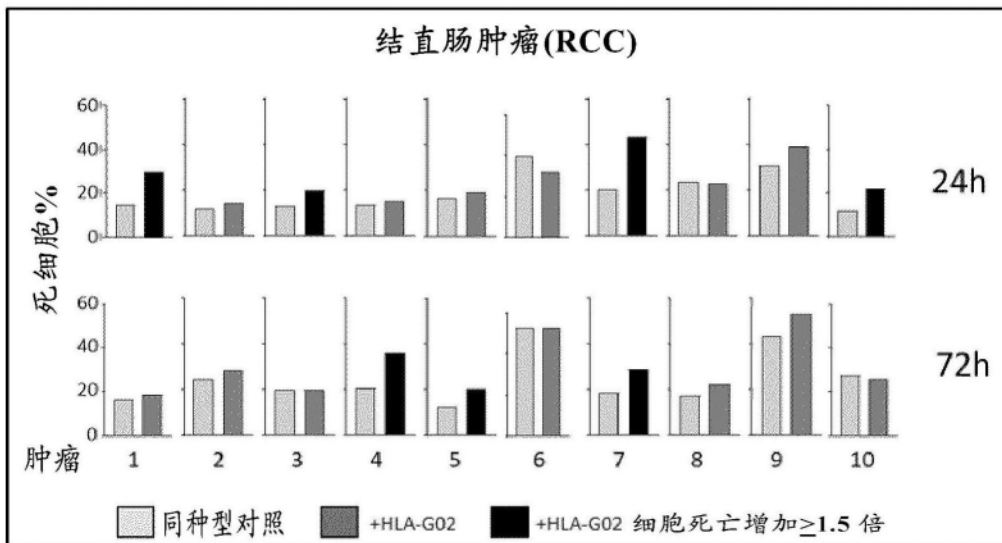


图 13D

图13续

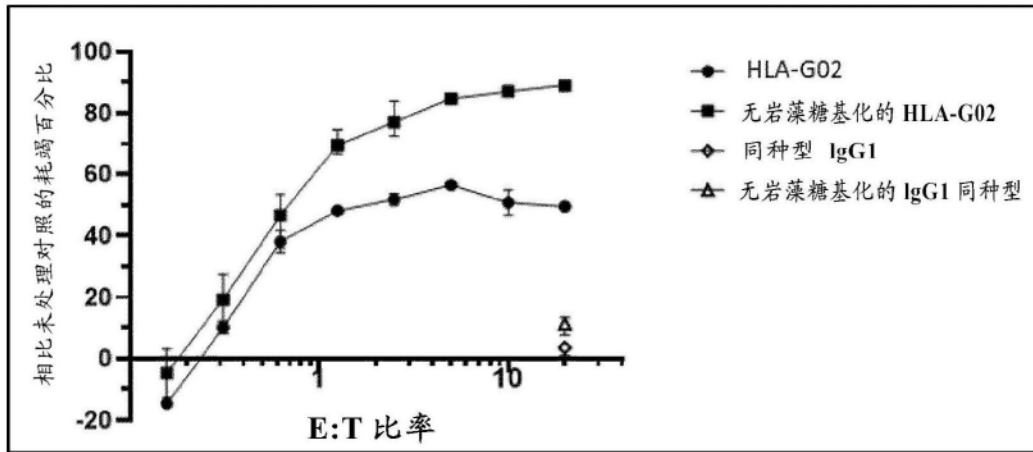


图14

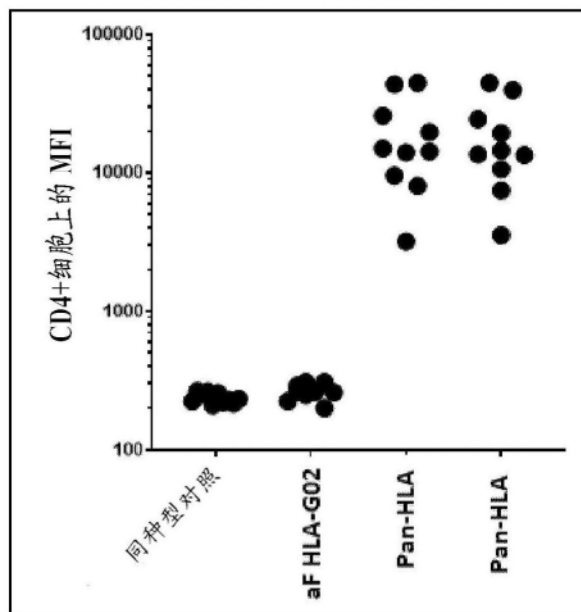


图15

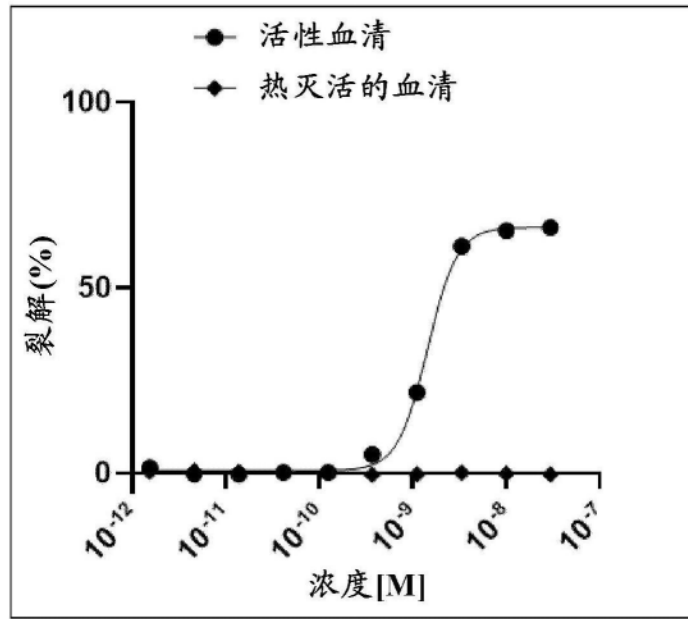


图 16A

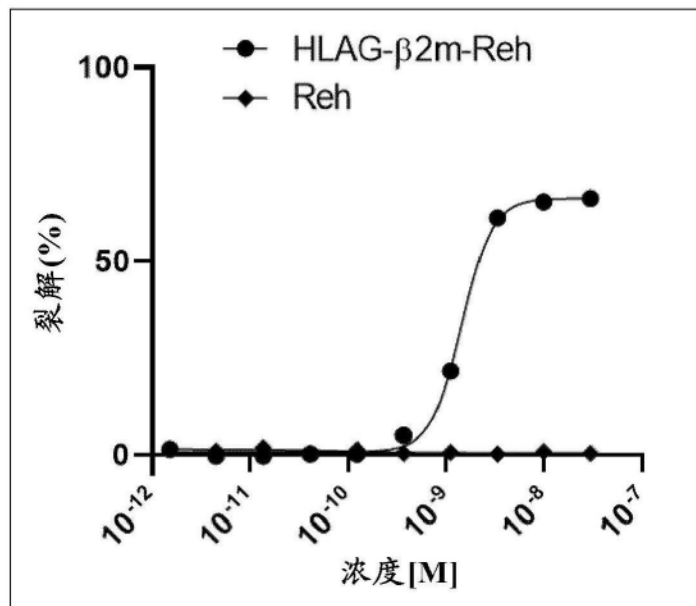


图 16B

图16

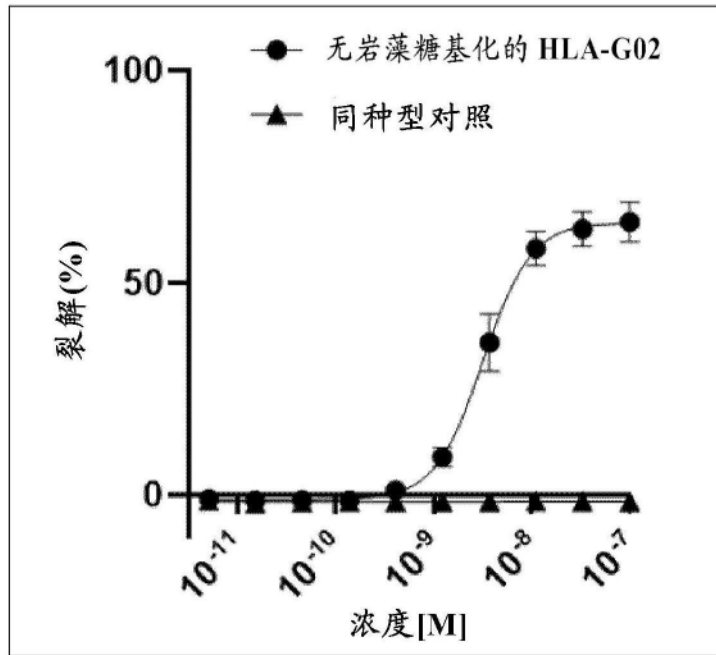


图 16C

图16续

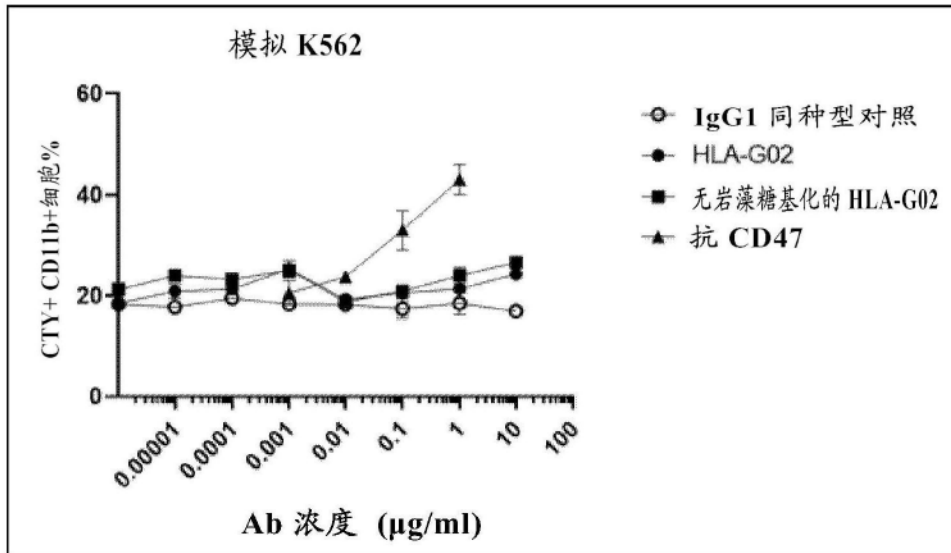


图 17A

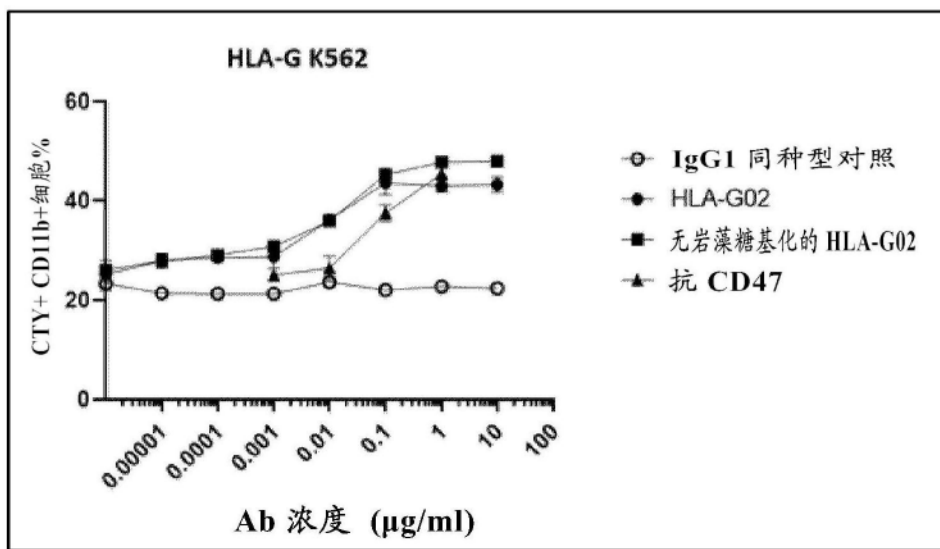


图 17B

图17

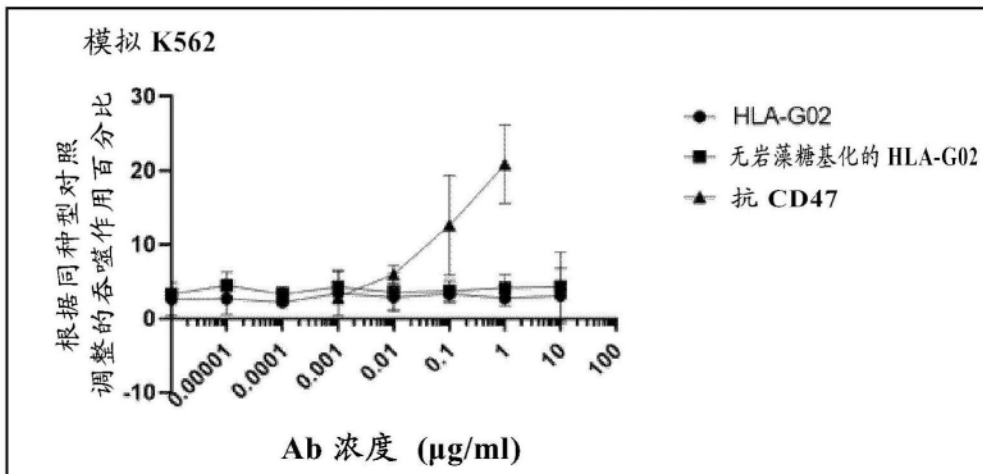


图 17C

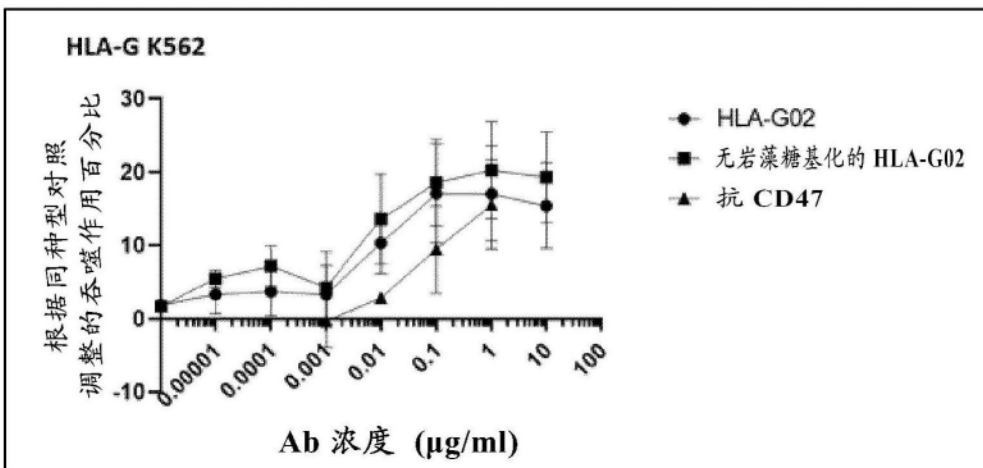


图 17D

图17续

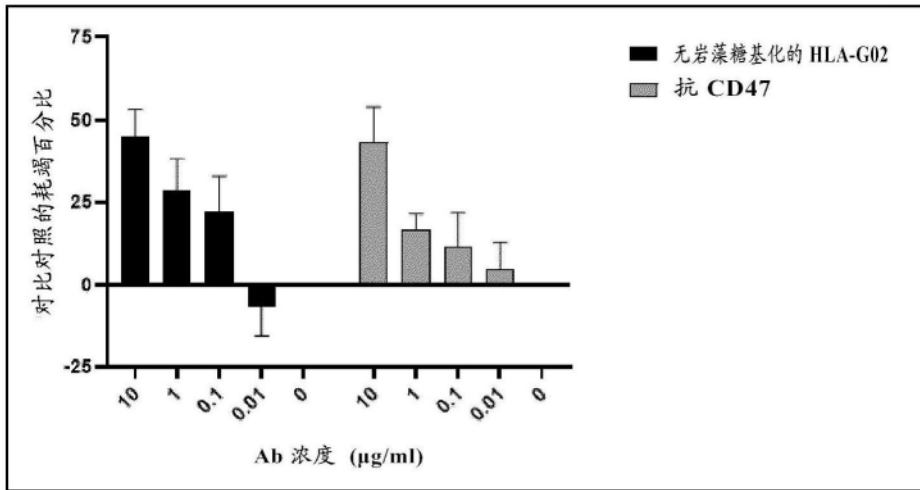


图18

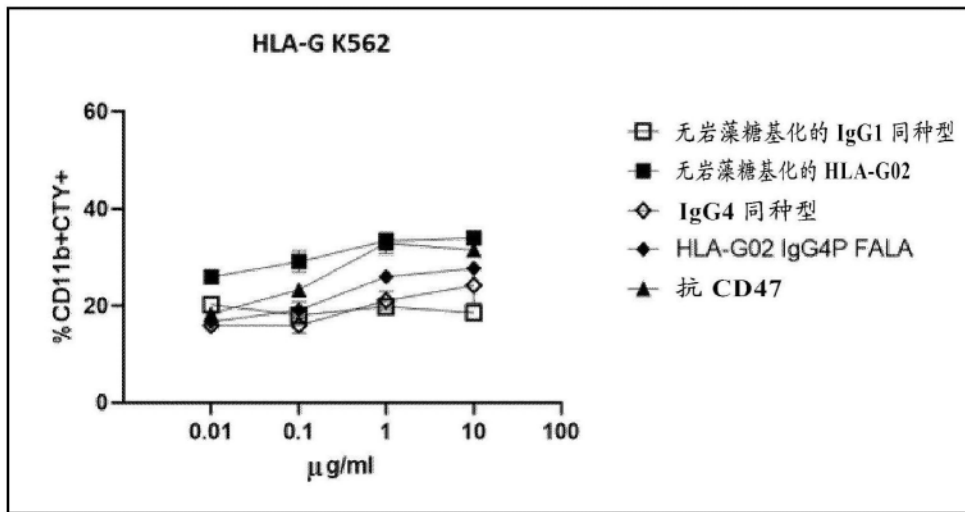


图 19A

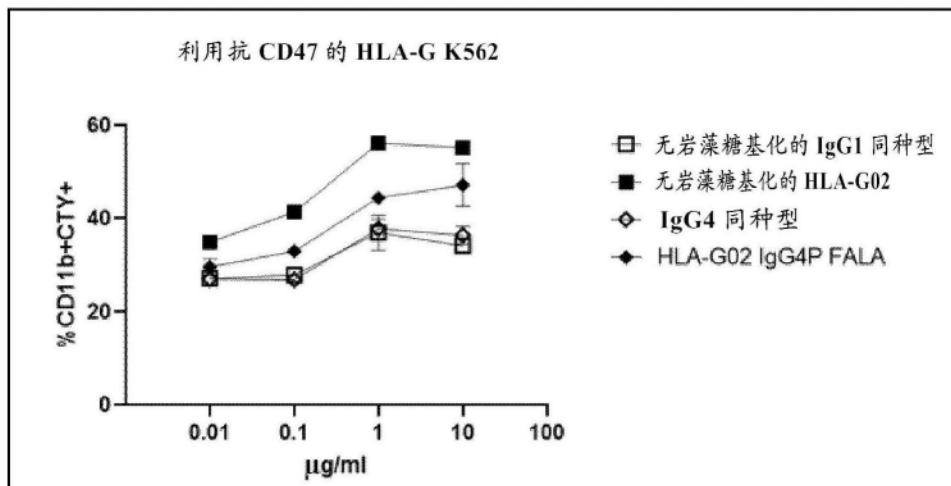


图 19B

图19

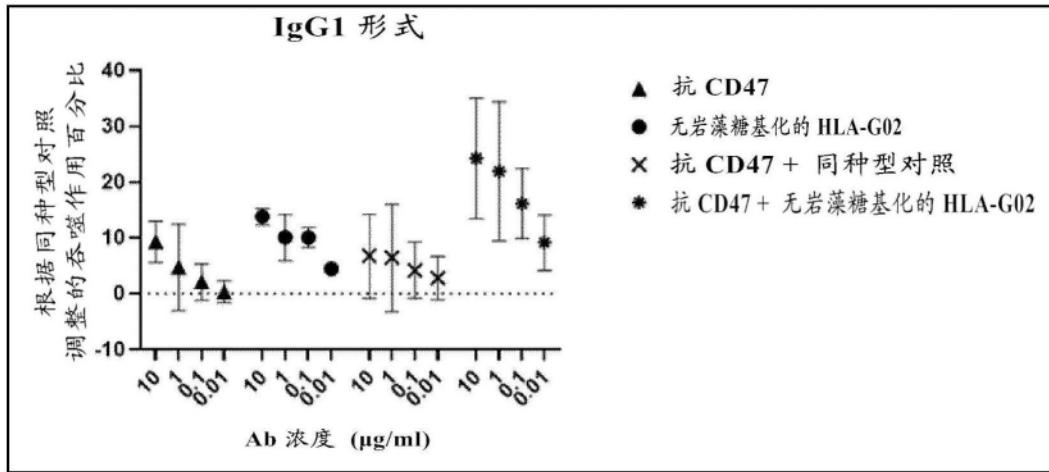


图 20A

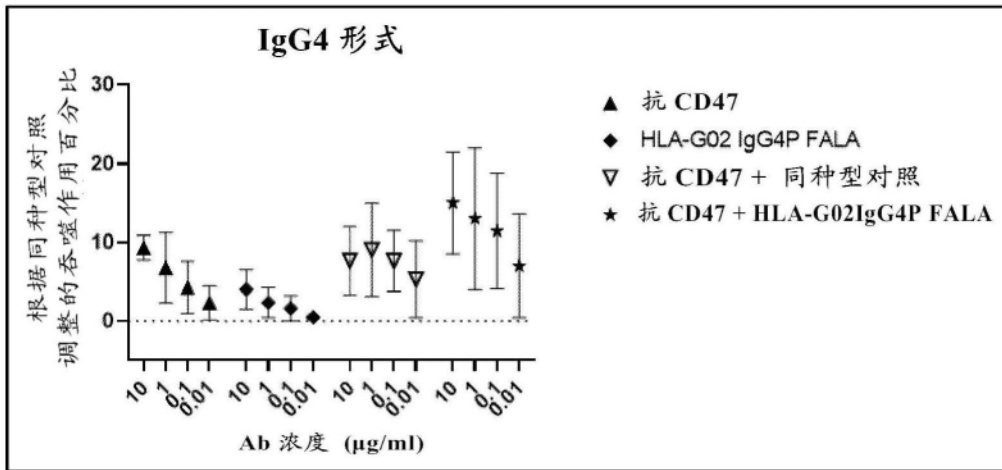


图 20B

图20

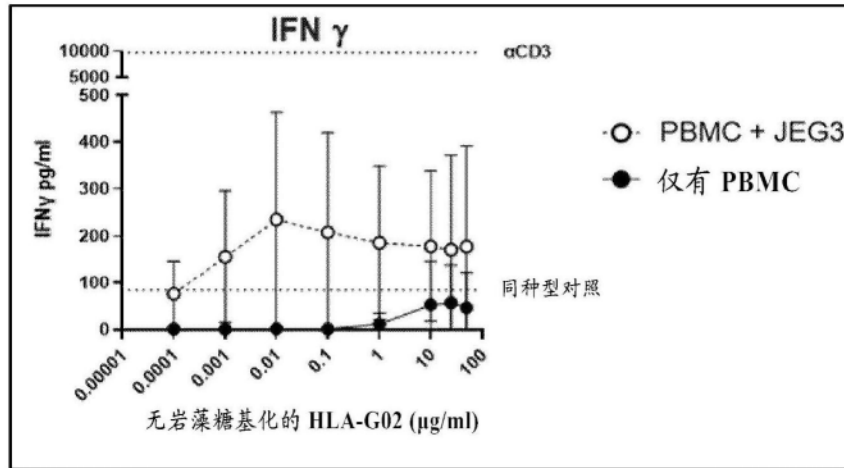


图 21A

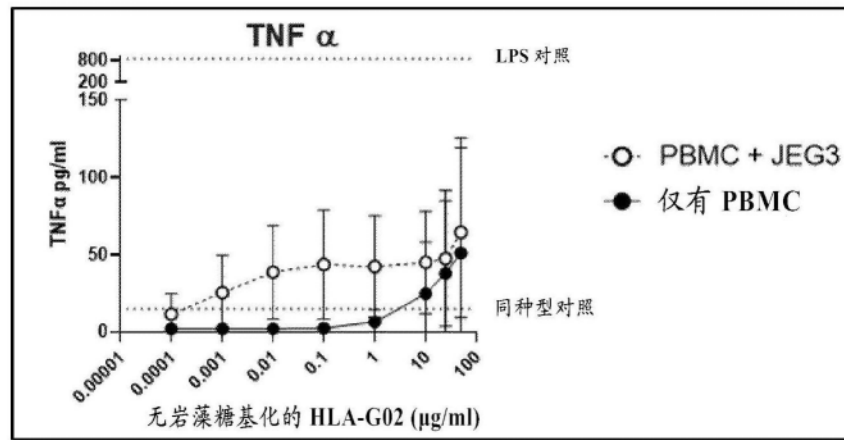


图 21B

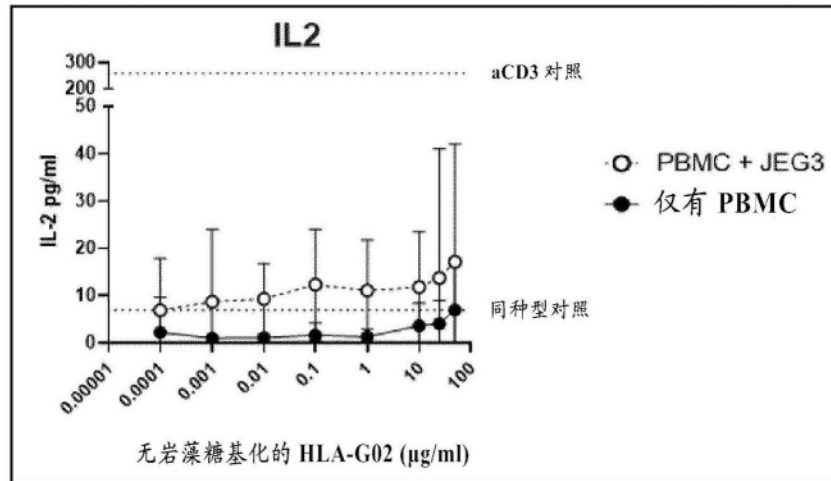


图 21C

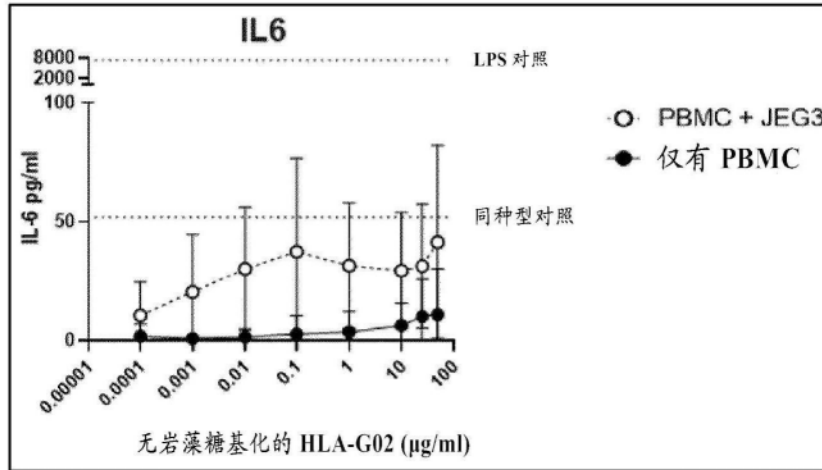


图 21D

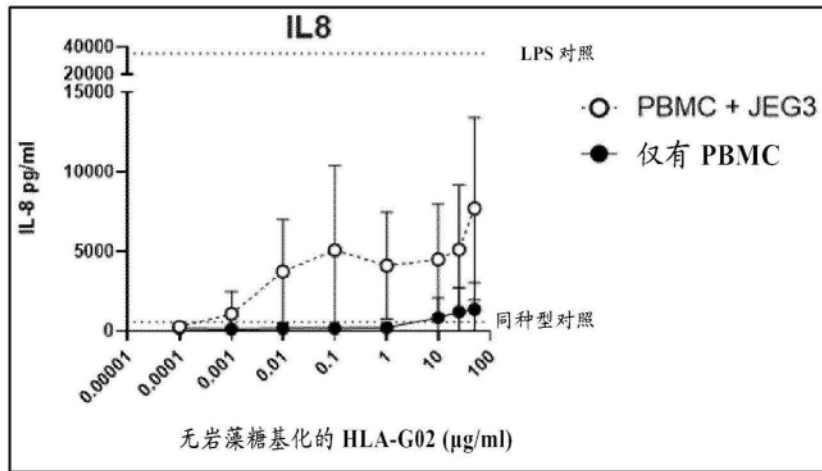


图 21E

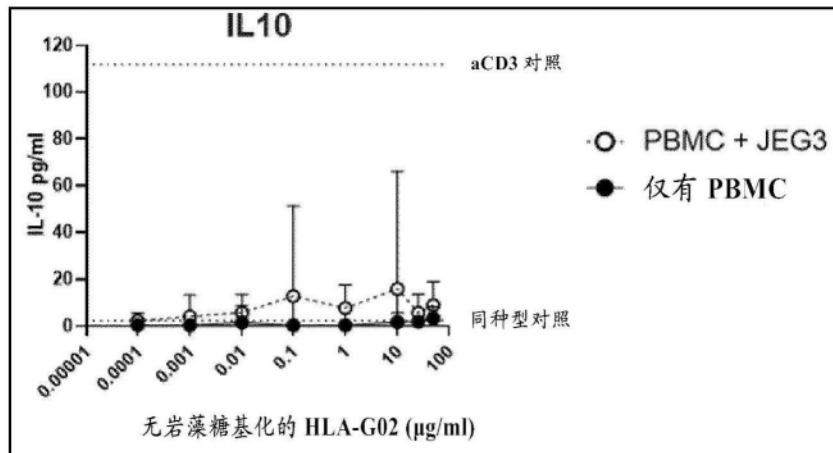


图 21F

图21续